

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Möröy am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

Vorsitzender des
Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Henkel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2003

Funktion der Pim-1 Kinase in der Zellzyklus-Progression

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Bio- und Geowissenschaften
der Universität Essen
vorgelegt von

Malte Bachmann

aus Bremen

September 2002

für Tiffy

Lebe Deinen Traum

ABKÜRZUNGEN

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. ZELLYKLUS.....	1
1.1.1. Zellzyklus-regulierende Proteine	2
1.1.1.1. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (cdks)	3
1.1.1.2. Funktionen der Cycline und deren cdks.....	3
1.1.1.3. cdk-Inhibitoren (CKI)	5
1.1.2. Änderung der subzellulären Lokalisation des Cyclin B1/cdk1-Komplexes und CDC25C (Takizawa und Morgan, 2000; Abb.1.3/1.4)	6
1.2. MALIGN ENARTUNG VON ZELLEN.....	10
1.2.1. Identifizierung von Proto-Onkogenen durch retrovirale Mutagenese.....	12
1.3. <i>PIM-1</i> ALS ONKOGEN.....	12
1.3.1. Pim-1 ist ein direktes Zielgen des JAK/STAT-Signalweges	13
1.3.2. Pim-1-Substrate und interagierende Proteine.....	14
1.4. ZIELSETZUNG.....	16
2. ERGEBNISSE	18
2.1. IDENTIFIKATION VON PIM-1-INTERAKTIONSPARTNERN MITTELS EINES HEFE-INTERAKTIONSSYSTEMS (RRS, ENGL.:RAS-RECRUITMENT-SYSTEM).....	18
2.1.1. Kontrolle der Bibliothek und des RRS-Systems	20
2.1.2. Suche nach Pim-1-Interaktionspartnern mittels des RRS-Systems	21
2.2. PIM-1 INTERAGIERT MIT C-TAK1 EBENFALLS IM HERKÖMMLICHEN HEFE-SYSTEM.....	24
2.3. HERSTELLUNG EINER NICHT-INTERAGIERENDEN C-TAK1-Y6131 PUNKTMUTANTE (RATTE).....	25
2.4. CHARAKTERISIERUNG DES POTENTIELLEN INTERAKTIONSPARTNERS C-TAK1-Y6131 (RATTE).....	26
2.4.1. Pim-1 interagiert mit C-TAK1-Y6131 (Ratte) in vitro.....	26
2.4.2. Kolokalisation von Pim-1 und C-TAK1-Y6131 in NIH 3T3-Zellen.....	27
2.5. IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG DES HUMANEN C-TAK1-GENS	29
2.5.1. C-TAK1-Expression.....	30
2.6. BIOCHEMISCHE INTERAKTIONSSUDIEN	32
2.6.1. Interaktion von Pim-1 und C-TAK1	32
2.6.2. Interaktion von Pim-1 und CDC25C	34
2.6.3. Kolokalisation von Pim-1/C-TAK1 und Pim-1/CDC25C.....	34
2.7. KINASIERUNGSEXPERIMENTE.....	39
2.7.1. CDC25C-Phosphorylierung durch C-TAK1 (Peng et al., 1998).....	39
2.7.2. C-TAK1-PM besitzen keine Kinase-Aktivität.....	41
2.7.3. C-TAK1-Phosphorylierung durch Pim-1	41
2.7.4. CDC25C wird durch Pim-1-wt phosphoryliert.....	47
2.8. ENDOGENE EXPRESSION VON PIM-1, C-TAK1 UND CDC25C.....	49
2.9. PIM-1 VERRINGERT DIE C-TAK1-KINASE-AKTIVITÄT	52
2.10. PIM-1 ERHÖHT DIE CDC25C-PHOSPHATASE-AKTIVITÄT	53
3. DISKUSSION	55
3.1. ISOLIERUNG VON C-TAK1	55
3.2. INTERAKTION ZWISCHEN PIM-1 UND C-TAK1.....	56
3.2.1. Inaktivierung von C-TAK1.....	56
3.2.2. Modellmechanismus der C-TAK1-Inaktivierung.....	57
3.3. AKTIVIERUNG VON CDC25C DURCH PIM-1	58
3.3.1. Mögliche Modellmechanismen der CDC25C-Aktivierung.....	59
3.4. VERKNÜPFUNG DES G ₂ /M-KONTROLLPUNKTES MIT EXTERNEN STIMULI	61
3.5. HYPOTHETISCHE ROLLE DER PIM-1-KINASE AM G ₂ /M-KONTROLLPUNKT	62

4. ZUSAMMENFASSUNG	65
5. MATERIAL UND METHODEN	66
5.1. CHEMIKALIEN, ENZYME, LÖSUNGEN.....	66
5.1.1. Häufig verwendete Lösungen.....	66
5.1.2. Verwendete Größenmarker	67
5.2. ARBEITEN MIT DNA.....	67
5.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1986).....	67
5.2.1.1. Herstellung von Punktmutanten (PM)	67
5.2.2. Restriktionsendonukleaseverdau	68
5.2.3. Konversion überhängender DNA-Enden	68
5.2.4. Dephosphorylierung von 5' Enden der DNA	68
5.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	68
5.2.6. Ligation.....	69
5.2.7. Agarose-Gelelektrophorese.....	69
5.2.8. Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präp).....	69
5.2.9. Präparative Plasmid-Isolierung (Qiagen-System).....	70
5.2.10. Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung.....	70
5.2.11. Sequenzierung von DNA	70
5.3. BAKTERIEN.....	70
5.3.1. Bakterienstämme	70
5.3.2. Bakterienmedien	70
5.3.3. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	71
5.3.4. Herstellung elektrokompenter Bakterien	71
5.3.5. Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien	72
5.4. HEFEN	72
5.4.1. Hefestämme.....	72
5.4.2. Hefemedien.....	72
5.4.2.1. Vollmedien.....	72
5.4.2.2. Mangelmedien.....	72
5.4.3. Transformation von Hefezellen	73
5.4.4. Ras-Recruitment-System (RRS, Broder et al., 1998)	74
5.4.5. Herstellung einer nicht-interagierenden Punktmutante in Hefe.....	75
5.4.6. Gesamtproteinextraktion aus Hefen	75
5.4.7. DNA-Präparation aus Hefe.....	76
5.4.8. Einfrieren und Auftauen von Hefezellen.....	76
5.4.9. β -Galaktosidase-Experiment	76
5.5. ZELLKULTUR	77
5.5.1. Zelllinien.....	77
5.5.2. Zellkulturmedien	78
5.5.3. Kultivierung der Zellen	78
5.5.4. Passagieren von Zellen	78
5.5.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen	79
5.5.6. Transiente Transfektion von Zellen	79
5.5.6.1. Elektroporation	79
5.5.6.2. Calcium-Phosphat	79
5.5.7. Immunfluoreszenz.....	80
5.6. PROTEINE.....	81
5.6.1. Gesamtproteinextraktion aus Zellen.....	81
5.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (Bradford, 1976).....	81
5.6.3. In-vitro Translation von Proteinen	82
5.6.4. Koimmunopräzipitation von Proteinen	82
5.6.5. Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien.....	83
5.6.6. C-TAK1-Antikörper-Herstellung.....	83
5.6.7. Kopräzipitation von Proteinen in-vitro.....	84
5.6.8. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)...	84
5.6.9. Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot (Immunoblot)).....	85

5.6.10.	Kinase-Experimente	86
5.6.11.	C-TAK1 Inaktivierungs-Experiment	87
5.6.12.	Phosphatase-Experiment	87
6.	LITERATURVERZEICHNIS	88
7.	ANHANG	
7.1.	PLASMIDE UND OLIGODESOXYNUKLEOTIDE ZUR KLONIERUNG	
7.1.1.	Hefe-Plasmide	
7.1.2.	Bakterielle und Eukaryotische Expressions-Plasmide	
7.2.	OLIGONUKLEOTIDE ZU DETEKTIERUNGSZWECKEN	
7.3.	DANKSAGUNGEN	
7.4.	LEBENS LAUF	
7.5.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNGEN	

Abkürzungen & Einheiten

Abkürzungen

A	Adenin bzw. Adenosin
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: bovine serum albumin)
C	Cytidin bzw. Cytosin
cdk	engl.: cyclin dependend kinase
cDNA	engl.: complementary DNA (komplementäre DNA (kopie-DNA))
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
ddH ₂ O	deionisiertes und destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5phenylphenatridiumbromid)
Fa.	Firma
FBS	fötales Kälberserum (engl.: FCS, Fetal-Calf-Serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HCl	Salzsäure
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
HRPO	Meerrettich-peroxidase (engl.: horseradish-)
G	Guanidin bzw. Guanin
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid
LacZ	β-Galaktosidase-Gen
LB-Medium	Luria Broth Base-Medium
Lsg.	Lösung
LSM	Laser-Scan-Mikroskop
mRNA	engl.: messenger-RNA (Boten-RNA)
NaOH	Natronlauge
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: open reading frame)
ori	origin of replication
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pH	-log [H ⁺]
PM	Punktmutation
Pol	Polymerase
RNA	eng.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium (engl.: sodium) dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

ss	einzelsträngige DNA
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymidin bzw. Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Uracil
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VT	Versene Trypsine
v/v	engl.: volume per volume
w/v	engl.: weight per volume
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosid

Für die Aminosäuren wurde teilweise der international anerkannte Einbuchstabencode verwendet.

Einheiten

bp	Basenpaare	min.	Minute
°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
g	Gramm	n	nano (10^{-9})
h	Stunde	n x g	n-fache Erdbeschleunigung
J	Joule	nt	Nukleotide
kb	Kilobasen	RLU	Relative Licht-Einheiten (relative light-units)
kDa	Kilodalton	sec.	Sekunden
l	Liter	U	Unit
M	molar	V	Volt
μ	mikro (10^{-6})		
m	milli (10^{-3})		
mA	Milli-Ampere		

1. Einleitung

1.1. Zellzyklus

Eine Zelle eines mehrzelligen Organismus besitzt neben dem Wachstum auch die Fähigkeit sich zu reproduzieren. Im adulten Organismus spielt die Zellteilung, z.B. bei der Immunantwort, sowie im proliferierenden Gewebe der Haut und des Darmepithels eine große Rolle. Die Phasen, die eine Zelle bei diesem Prozess immer wieder durchläuft, nennt man Zellzyklus. Der Zellzyklus besteht in seiner einfachsten Form aus einer DNA-Synthese-Phase (S-Phase) und einer Zellteilungs-Phase (Mitose, M-Phase). Eine solche verkürzte Form findet man allerdings nur in Prokaryoten (Autret *et al.*, 1997). Bei Eukaryoten ist der Zellzyklus durch die höhere Komplexität des Genoms etwas umfassender. Es haben sich Kontrollmechanismen entwickelt, um die fehlerfreie Replikation der DNA und damit die korrekte Weitergabe des Erbgutes zu gewährleisten. Dafür existieren zwischen der S- und der M-Phase sogenannte Ruhephasen (engl., gap: G-Phase), in denen Kontrollfunktionen ausgeübt werden. Der eukaryotische Zellzyklus unterteilt sich in eine G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase. Die G_1 -, S- und G_2 -Phase werden zusammen auch als Interphase bezeichnet. Die Abschnitte dieser Phasen sind von unterschiedlicher Dauer und unterschiedlicher Funktion. Nach der Zellteilung erhöht sich das Zellvolumen sowie die Anzahl der Organellen. In der S-Phase findet die Synthese aller notwendiger Baustoffe für die Replikation des Chromosomensatzes statt. In der G_2 -Phase beginnt die Verdopplung des Zentrosoms und das replizierte Genom wird auf Fehler kontrolliert. Ist die Verdopplung des Chromosomensatzes korrekt, wird die Mitose eingeleitet. Die Mitose wird in eine Pro-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilt und bildet mit der den Zellzyklus abschließenden Zytokinese die M-Phase. Eine weitere Phase ist die G_0 -Phase. Sie wird durch das Fehlen von Wachstumsstimuli (Hormone, Nährstoffmangel) eingeleitet und ist durch Zufuhr dergleichen reversibel. Durch Seneszenz oder terminale Differenzierung kann ein weiteres G_1 -Stadium erreicht werden, welches einen programmierten Zelltod (Apoptose) zur Folge hat. Im Zellzyklus gibt es an verschiedenen Stellen sogenannte Kontrollpunkte (engl.: checkpoints). Die wichtigsten sind zwischen der G_1 -/S-Phase und der G_2 -/M-Phase. Die Zelle kann an diesen Kontrollpunkten arretieren und die dadurch gewonnene Zeit zur Reparatur oder zur Einleitung der Apoptose nutzen. Ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt liegt in der späten G_1 -Phase und wird als Restriktionspunkt (R) bezeichnet (in Hefe: Startpunkt; Hartwell *et al.*, 1974 und 1989). Ist dieser Punkt passiert, muss die Zelle den Zellzyklus bis zum nächsten Kontrollpunkt durchlaufen. Ein Einfluss exogener Stimuli ist dann nicht mehr möglich.

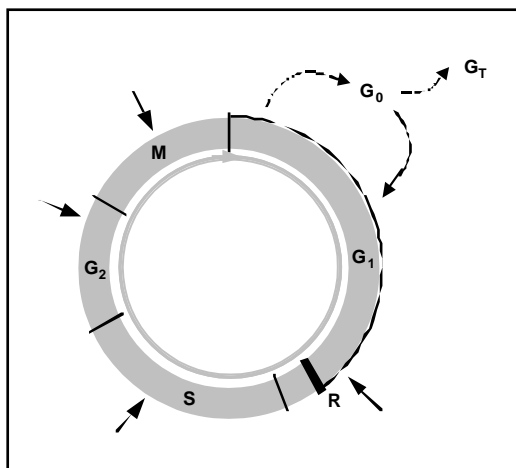


Abb.1.1 Schematische Darstellung des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in verschiedene Phasen unterteilt. Mitogene Einflüsse können in der G₁-Phase eine Wirkung auf die Zelle ausüben (schwarz markierter Teil). Der Restriktionspunkt ist durch R gekennzeichnet. Die jeweiligen Kontrollpunkte (engl.: checkpoints) im Zellzyklus sind durch Pfeile markiert. G₁: erste Ruhephase, S: Synthesephase, G₂: zweite Ruhephase, M: Mitose, G₀: Dauerruhephase, G_T: terminales Differenzierungsstadium.

Der Zellzyklus ist einer Vielzahl von Signalen bzw. Stimuli ausgesetzt. Wachstumsfaktoren wie EGF (engl.: **e**pithelial **g**rowth **f**actor) oder Interleukine können ihre Wirkung nur innerhalb der G₁-Phase ausüben. Es werden verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt, deren Endziel über den Ras-Signalweg u. a. die Cyclin D1-Expression ist (Marshall *et al.*, 1999). Das Tumorsuppressor-Protein p53 wird durch DNA-Schädigungen aktiviert und arretiert die Zellen in der G₁-Phase. Damit wird gewährleistet, dass die DNA-Schäden behoben werden, bevor die Zelle weiter proliferiert. Nur der reibungslose Verlauf des Zellzyklus gewährleistet den Fortbestand eines Organismus. Eine Deregulation der Zellzyklusprogression kann in Apoptose oder in maligner Transformation enden. Untersuchungen zur Regulation der Zellzyklusprogression haben sehr zum besseren Verständnis maligner Erkrankungen beigetragen. Neben der Kontrolle der Genexpression auf Transkriptionsebene spielt im Zellzyklus die posttranslationale Modifikation eine große Rolle. So können Proteine stabilisiert oder für eine Degradation markiert werden, aber auch durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung aktiviert oder inaktiviert werden. Weiterhin kann durch eine Modifikation die Affinität zu einem Bindungspartner erhöht, verringert oder die intrazelluläre Lokalisation verändert werden. So kann ein Protein cytoplasmatisch oder nukleär lokalisiert sein, oder in bestimmten subzellulären Bereichen gespeichert werden.

1.1.1. Zellzyklus-regulierende Proteine

Die entscheidenden Stellen des Zellzyklus werden u.a. durch Kinasen reguliert. Die ersten Hinweise wurden in den Hefestämmen *S.cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* entdeckt. Hier sind Proteine beschrieben worden, deren Expressionsmuster sich mit den beschriebenen Zellzyklusphasen periodisch ändert (Evans *et al.*, 1983). Aufgrund dieses zyklischen Expressionsverhaltens wurden sie Cycline genannt. Sie stellen Untereinheiten von Kinasen dar, deren Aktivität abhängig von der Cyclin-Expression reguliert werden kann. Diese bezeichnet man mit der Abkürzung cdk (engl.: **c**yclin **d**ependent **k**inase). Cyclin/cdk-Komplexe sind nach Aktivierung in der Lage, bestimmte Substrate zu phosphorylieren und stellen typische Marker für verschiedene Zellzyklusabschnitte dar. Ein

Konsensusmotiv in Cyclinen ist die "Cyclin-Box", die zur Interaktion und Aktivierung einer speziellen Kinase von großer Bedeutung ist (Kobayashi *et al.*, 1992, Lees und Harlow, 1993). Während eine "PEST"-Box-AS-Sequenz bei den in der G₁-Phase exprimierten Cyclinen für die rasche Degradierung durch das 26S-Proteasom verantwortlich ist, handelt es sich bei den mitotischen Cyclinen um eine 10 AS große "Zerstörungs"-Box (engl.: destruction-Box). In beiden Fällen werden die Zielproteine über Ubiquitinierung für den Abbau markiert (Glutzer *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 1986).

1.1.1.1. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (cdks)

Zur Zeit sind 11 eukaryotische Cyclin-Klassen bekannt, die in unterschiedlichen Zellzyklusphasen exprimiert werden können. Es gibt sowohl Cyclin-Isoformen, die verschiedene Funktionen haben und ubiquitär vorkommen (B-Typ-Cycline), als auch Cycline, die gewebespezifisch exprimiert werden (D-Typ-Cycline) (Sherr, 1993). In Eukaryoten interagieren verschiedene Cycline mit verschiedenen cdks, wobei es Überschneidungen gibt. Die Expression der cdks ist unabhängig vom Zellzyklus. Heute kennt man neun verschiedene dieser hochkonservierten Serin/Threonin-Kinasen (cdk1-9). Alle cdks besitzen eine Cyclin-Interaktionsdomäne und einen ATP-Phosphat-Anker, der für ATP-abhängige Kinasen charakteristisch ist. Cdks besitzen keine NLS-Sequenz (engl.: nuclear localisation signal), so dass sie nur durch Interaktion mit anderen Proteinen (Cycline) in den Zellkern gelangen können. Die Regulierung unterliegt einem komplexen Mechanismus, in dem Phosphorylierungen, Dephosphorylierungen und Interaktionen mit inhibitorischen Proteinen (1.1.1.3.) eine zentrale Bedeutung einnehmen.

1.1.1.2. Funktionen der Cycline und deren cdks

Cyclin D1, D2 und D3 üben ihre Hauptfunktion in der G₁-Phase aus (Baldin *et al.*, 1993; Matsushime *et al.*, 1992; Xiong *et al.*, 1991). Die D-Typ-Cycline aktivieren die Kinasen cdk4 und cdk6 (Matsushime *et al.*; Meyerson und Harlow, 1994). Die Transkription des *Cyclin D1*-Gens wird durch mitogene Signale und letztendlich Expression der Transkriptionsfaktoren wie AP-1, Myc oder NFκB stimuliert (Bakiri *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 1999; Guttridge *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1999).

Cyclin E übernimmt eine entscheidende Rolle in der späten G₁-Phase und wird bis zum Ende der S-Phase exprimiert (Jackson *et al.*, 1995; Ohtsubo *et al.*, 1995; Resnitzky *et al.*, 1995). Cyclin E bindet und aktiviert cdk2. Die Transkription des *Cyclin E*-Gens wird von verschiedenen Mitgliedern der E2F-Proteinfamilie und von der Aktivität des Cyclin D1/cdk4 oder cdk6-Komplexes reguliert. Dieses geschieht über Inaktivierung des inhibitorischen pRb-Proteins (Retinoblastoma-Protein) (Sherr, 1994). Durch einen Rückkopplungsmechanismus auf den Transkriptionsfaktor E2F kann sich Cyclin E selbst transkriptionell aktivieren (Morris *et al.*, 2000).

Cyclin A spielt eine wichtige Rolle in der S-Phasen-Regulation und für den Eintritt in die Mitose (Girard *et al.*, 1991, Pagano *et al.*, 1992). Sowohl Cyclin A als auch Cyclin B1 aktivieren cdk1 (=cdc2). Die Expression von Cyclin A kann von einem Multiproteinkomplex (pRb/hSWI/SNF-Komplex) reprimiert werden, welcher wiederum durch Cyclin E reprimierbar ist (Zhang *et al.*, 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass Cyclin A/cdk2 für die Chromosomen-Kondensation und weitere frühe Ereignisse der S-Phase verantwortlich sein soll (Furuno *et al.*, 1999).

Cyclin H bildet zusammen mit cdk7 und Mat1 den CAK-Komplex (engl.: **cdk activated kinase**). CAK phosphoryliert den Cyclin B1/cdk1-Komplex an dem Threonin-Rest 161 der cdk1-Kinase und ist so mitverantwortlich für die Aktivierung dieses Komplexes in der späten G₂-Phase (Fesquet *et al.*, 1993; Fisher und Morgan, 1994; Makela *et al.*, 1994; Nigg, 1996; Tassan *et al.*, 1994). Die CAK-Expression ist wiederum durch das Tumorsuppressor-Protein p53 reprimierbar (Schneider *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb des cdk-Proteins, so dass eine bessere Substrat- und Cyclin-Bindung ermöglicht wird. Die cdk1-Kinase wiederum phosphoryliert cdk7 und aktiviert diese so durch eine Rückkopplungsschleife (Garrett *et al.*, 2001, Nigg, 1996). Eine weitere Funktion von cdk7 ist, die RNA-Polymerase II und evtl. weitere Substrate, die mit der DNA-Reparatur verknüpft sind, zu phosphorylieren (Drapkin *et al.*, 1996; Svejstrup *et al.*, 1996). Der CAK-Komplex ist während des gesamten Zellzyklus exprimiert und somit nur über Modifikationen aktivierbar bzw. regulierbar (Schneider *et al.*, 2002). Die Phosphatase KAP (engl.: **kinase associated phosphatase**) wirkt als ein antagonistisches Enzym zur CAK (Hannon *et al.*, 1995)(Abb.1.4).

Die B-Typ-Cycline sind für die Regulierung des G₂/M-Übergangs verantwortlich. Cyclin B1 liegt mit cdk1 als inaktiver Komplex vor, der am Ende der G₂-Phase durch Dephosphorylierung bzw. Phosphorylierung aktiviert wird, als MPF-Komplex (MPF-Komplex, engl.: **maturation promoting factor**) in den Kern transloziert und dort M-Phase Gene initiiert. Dieser Vorgang ist essentiell für den Eintritt in die Mitose (Hagting *et al.*, 1998,; Jin *et al.*, 1998; Ohi und Gould, 1999; Takizawa und Morgan, 2000). Die Akkumulation von Cyclin B1/cdk1-Komplexen wird u.a. durch die Inaktivierung des APC/C-Komplexes (engl.: **anaphase promoting complex/ cyclosome**) durch den Cyclin A/cdk2-Komplex erreicht (Furuno *et al.*, 1999). Dieser Komplex ist für die Degradation der mitotischen Cycline verantwortlich. Da Cyclin A in der Mitose kaum noch aktiv ist bzw. exprimiert wird, ist eine Degradation von Cyclin B1 durch APC/C nach Eintritt in die Mitose gewährleistet. Der Cyclin B1/cdk1-Komplex ist an der Regulation des Spindelapparates, der Centrosomen-Separation, an dem Aufbau des Mikrotubuli-Netzwerkes, des Zytoskeletts und

des Golgi-Apparates beteiligt, so dass ein geordneter Ablauf der Mitose gewährleistet ist (Jackman *et al.*, 1995).

1.1.1.3. cdk-Inhibitoren (CKI)

Die Aktivität der Cycline und cdk's ist zusätzlich durch Inhibitoren der cdk's steuerbar (CKI, engl.: Cyclin dependend kinase Inhibitor). Diese Inhibitoren können durch direkte Bindung an cdk's deren Aktivität beeinflussen. Dabei handelt es sich zum Einen um Proteine der Ink4-Familie (engl.: Inhibitor of cdk4) (Chan *et al.* 1995, Hannon und Beach, 1994, Koh *et al.*, 1995, Lukas *et al.*, 1995, Ruas und Peters, 1998, Serrano *et al.*, 1993) und zum Anderen um die Cip/Kip-Proteine (engl.: Cyclin inhibitory protein/ Kinase inhibitory protein) (Hengst und Reed, 1998, Nakayama, 1998). Erstere umfasst die Proteine p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} und p19^{Ink4d}, die in der Lage sind, cdk4 und cdk6 durch direkte Bindung zu hemmen und einen G₁-Arrest auszulösen. Durch die Bindung von p16 und p19 an die nicht an Cycline gebundenen cdk4/cdk6-Kinasen, wird die ATP-Bindung durch strukturelle Änderungen verhindert (Baumgartner *et al.*, 1998; Brotherton *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1998; Venkataramani *et al.*, 1998). Die zweite Gruppe besteht aus den Mitgliedern p21^{Cip}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} (el-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995; Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima und Hunter, 1994). Diese besitzen ein breiteres Spektrum an cdk's, die gebunden und inaktiviert werden können. Die Bindung an die cdk's ist Cyclin-unabhängig. Die Inhibierung kommt auch hier durch die Blockierung der ATP-Bindung zustande (Kato *et al.*, 1994; Russo *et al.*, 1998), was ebenfalls zu einem G₁-Arrest führt. Das p21-Protein wird z.B. nach DNA-Schädigung durch p53 induziert. So wird entweder der Zellzyklus zu Gunsten der Reparatur der DNA-Schäden arretiert oder die Apoptose eingeleitet (el-Deiry *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Mowat, 1998; Weinert, 1998). Bereits durch eine minimale Änderung der Expression eines Cyclins oder eines Inhibitors, kann die Zellzyklusprogression beschleunigt oder verlangsamt werden (Sherr und Roberts, 1999).

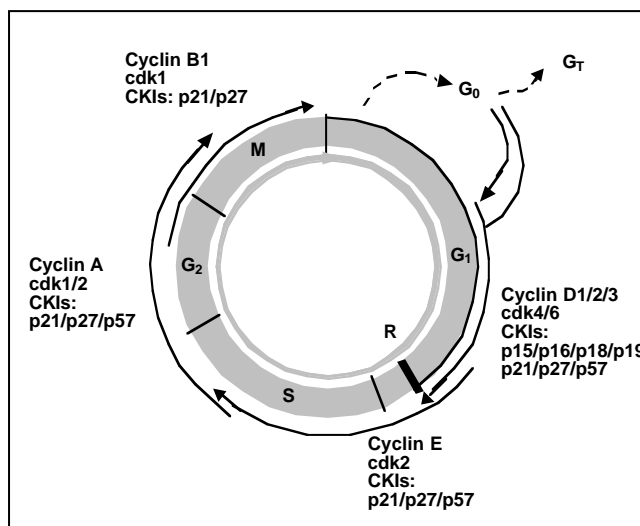


Abb.1.2 Schematische Darstellung der Cyclin-, cdk- und CKI-Expression innerhalb des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in verschiedene Phasen unterteilt. Mitogene Einflüsse können in der G₁-Phase eine Wirkung auf die Zelle ausüben (schwarz markierter Teil). Der Restriktionspunkt ist durch R gekennzeichnet. Die Pfeile symbolisieren den Zeitraum der Cyclin-Expression sowie die Komplexbildung mit den jeweiligen cdk's und die mögliche Inaktivierung durch CKIs. G₁: erste Ruhephase, S: Synthesephase, G₂: zweite Ruhephase, M: Mitose, G₀: Dauerruhephase, G_T: terminales Differenzierungsstadium.

1.1.2. Änderung der subzellulären Lokalisation des Cyclin B1/cdk1-Komplexes und CDC25C (Takizawa und Morgan, 2000; Abb.1.3/1.4)

Nukleäre Ereignisse der Mitose finden statt, sobald der Cyclin B1/cdk1-Komplex während der Prophase in den Kern transloziert. Bei diesem Prozess spielt die Lokalisation der aktivierten Phosphatase CDC25C eine große Rolle. Änderungen des Phosphorylierungsstatus dieser beiden Proteine helfen der Zelle den Beginn der Mitose zu kontrollieren (Ohi und Gould, 1999). Neben dem G₁/S-Kontrollpunkt gewinnt der G₂/M-Kontrollpunkt immer mehr an Bedeutung. Die meisten Untersuchungen weisen darauf hin, dass CDC25C, wie Cyclin B1/cdk1, während der Interphase eine cytoplasmatische Lokalisation aufweisen. Humanes CDC25C enthält eine NLS-Sequenz (AS 240-244, KVKKK) und eine leucin-reiche NES-Sequenz (engl.: **nuclear export sequenz**; AS 190-199, LXXXLXXLXL) (Graves *et al.*, 2001). Während der Interphase wird CDC25C an Ser216 durch C-TAK1 (engl.: **CDC-twentyfive associated kinase 1**) phosphoryliert, was zu einer Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen und infolgedessen zur Inaktivierung führt (Peng *et al.*, 1998). Durch seine Bindung an 14-3-3-Adapter Proteine wird der Import von CDC25C in den Kern inhibiert, da die NLS-Sequenz sich in der Nähe von der AS Ser216 befindet. CDC25C/14-3-3-Komplexe sind während der kompletten Interphase präsent (Dalal *et al.*, 1999; Graves *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 1998,). C-TAK1 ist ebenfalls in der Lage, Einfluss auf den Ras-Signalweg zu nehmen. Durch Phosphorylierung und Interaktion mit 14-3-3-Adapter-Proteinen wird KSR1 (engl.: **Kinase Suppressor of Ras 1**; AS Ser392) im unstimulierten Zustand im Cytoplasma zurückgehalten (Muller *et al.*, 2001). Unter Stimulation des Ras-Signalweges ist diese Phosphorylierung vermindert und der Komplex transloziert an die Cytoplasmamembran und interagiert mit Raf und MAPK (engl.: **mitogen activated protein kinase**).

Unreplizierte DNA oder DNA-Schäden sind für einen G₂-Block verantwortlich. Die beiden Kinasen chk1 und cds1, die durch DNA-Schädigungen aktiviert werden, phosphorylieren CDC25C ebenfalls an der AS Ser216, wodurch die Progression in die M-Phase verhindert wird (Blasina *et al.*, 1999; Furnari *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1997). Dadurch entsteht die Möglichkeit, die Schäden zu reparieren. Zusätzlich wird die Kinase Wee1 phosphoryliert und aktiviert, wodurch der Cyclin B1/cdk1-Komplex inaktiviert wird (Baldin und Ducommun, 1995; Heald *et al.*, 1993). Ob die CDC25C-aktivierende Kinase Plk1 (engl.: **Polo like kinase 1**) durch chk1 und cds1 inhibiert wird, ist noch unklar. Bisher gibt es weder Hinweise darauf, wie C-TAK1 reguliert werden kann, noch welcher Effekt für das Abdissoziieren des 14-3-3-Adapters-Proteins von CDC25C verantwortlich ist. Die Phosphatase, die die Dephosphorylierung des Ser216 von CDC25C katalysiert, ist ebenfalls

noch unbekannt. Es gibt Hinweise, dass dieses durch eine Isomerase katalysiert wird (Stukenberg und Kirschner, 2001; Zhou *et al.*, 2000). Die Dephosphorylierung von CDC25C ist ein entscheidender Schritt, CDC25C zu aktivieren. Zusätzlich braucht CDC25C eine Hyperphosphorylierung des N-terminalen Bereichs von 12-20 AS, um vollständig aktiv zu werden, Cyclin B1/cdk1 zu dephosphorylieren und dementsprechend das Programm Mitose ablaufen zu lassen. Diese Hyperphosphorylierung trägt auch zur Inhibierung der NES-Funktion bei (Hagting *et al.*, 1999; Kumagai und Dunphy, 1999; Li *et al.*, 1997; Pines und Hunter, 1994; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002). Dieses wurde bisher nur von der Plk1-Kinase oder von dem Xenopus-Plk1-Homolog Plx1 katalysiert (Abrieu *et al.*, 1998; Cogswell *et al.*, 2000; Kumagai und Dunphy, 1996; Qian *et al.*, 2001). Die Kinase Plk1 phosphoryliert u.a. Ser198, welches die Bindung des Exportins Crm1 an die NES-Sequenz verhindert (Yang *et al.*, 1998). Somit akkumuliert CDC25C im Nukleus und kann dort seine Aktivität entfalten. Plk1 wiederum wird von einer durch DNA-Schäden aktivierten E3-Ubiquitin-Ligase ubiquitiniert und dem 26S-Proteasom zugeführt (Kang *et al.*, 2002).

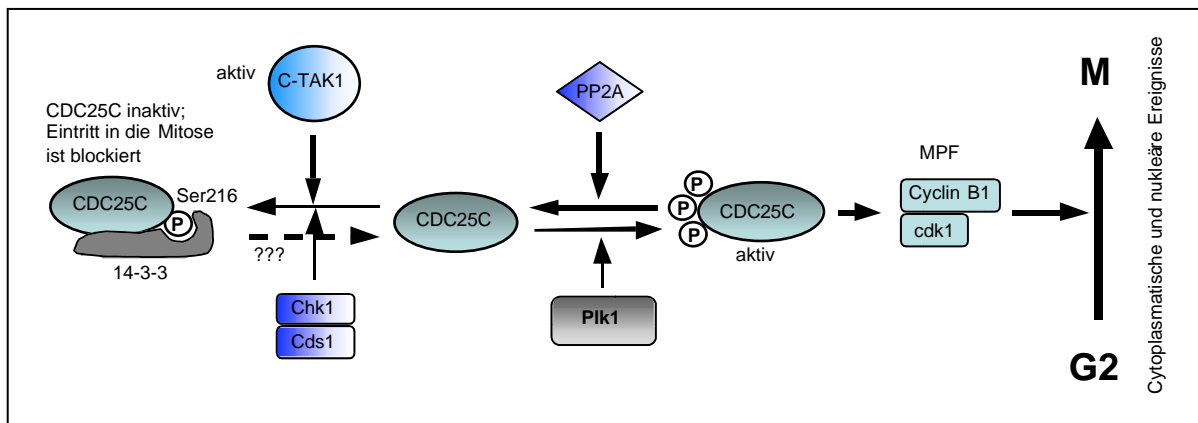


Abb.1.3 Molekulare Mechanismen zur Kontrolle der Aktivierung von CDC25C zu Beginn der Mitose

CDC25C wird an der AS Ser216 durch C-TAK1 und den Kinasen chk1 und cds1, die durch DNA-Schäden aktiviert werden, phosphoryliert und durch Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen inaktiviert. Die Dephosphorylierung an der AS Ser216 der CDC25C-Phosphatase erfolgt nach einem bisher unbekannten Mechanismus. CDC25C benötigt eine Hyperphosphorylierung am N-Terminus, welches durch Plk1 bewerkstelligt wird, um vollständig aktiv zu werden. Die Dephosphorylierung wiederum erfolgt durch die Phosphatase PP2A. Die Aktivierung von Cyclin B1/cdk1 fängt mit der Dephosphorylierung durch CDC25C an. Der letztendlich hyperphosphorylierte Cyclin B1/cdk1-Komplex akkumuliert im Nukleus und initiiert die Mitose. Allerdings werden zuvor ebenfalls cytoplasmatische Ereignisse wie Centrosomen-Separation und Golgi-Umlagerung initiiert. Die Lokalisation der verschiedenen Proteine ist nicht berücksichtigt. MPF: engl.: maturation promoting factor; ???: bisher nicht geklärt.

Die cdk1-Aktivierung ist ebenfalls ein mehrstufiger Prozess, welcher mit der Bindung des regulatorischen Cyclin B1 beginnt. Die cdk1-Kinase wird durch Phosphorylierung an der AS-Tyr15 (durch die Kinase Wee1) und Thr14/Tyr15 (durch die Kinase Myt1) während der Interphase in einem inaktiven Status gehalten. Während Wee1 bis auf die Prophase nukleär lokalisiert ist, befindet sich die Myt1-Kinase während des gesamten Zellzyklus im Cytoplasma

(Mueller *et al.*, 1995). Überexpression von Myt1 verzögert den Start der Mitose, da der inaktive Komplex Cyclin B1/cdk1 im Cytoplasma zurückgehalten wird. Die Dephosphorylierung des Cyclin B1/cdk1-Komplexes durch CDC25C ist der erste Schritt der Aktivierung. Eine cdk1-Thr161-Phosphorylierung durch CAK aktiviert den Cyclin B1/cdk1-Komplex. Dieser aktivierte Komplex ist nun in der Lage, CDC25C am N-Terminus zu phosphorylieren (Hoffmann *et al.*, 1993). Die cdk1-Kinase aktiviert somit ihren eigenen Aktivator, was zu einem positiven Rückkopplungseffekt führt (Abb.1.4). Weiter hat aktiviertes cdk1 die Möglichkeit den Inhibitor Wee1 durch Phosphorylierung zu inaktivieren. Es gibt auch Hinweise darauf, dass Plk1 ebenfalls in eine positive Rückkopplungsschleife einbezogen werden kann. Auch Cyclin B1 wird durch cdk1 aktivierend phosphoryliert. Für weitere Phosphorylierung ist Plk1 zuständig (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2000/ Abb.1.4). Somit wird der Cyclin B1/cdk1-Komplex durch CDC25C, CAK, sich selbst, und Plk1 aktiviert

Die Kontrolle der Cyclin B1/cdk1-Kinase-Lokalisation durch diverse Modifizierungen ist für den G₂/M-Kontrollpunkt essentiell. Der Cyclin B1/cdk1-Komplex wird kontinuierlich zwischen Kern und Cytoplasma hin und her transportiert (Moore *et al.*, 1999; Takizawa *et al.*, 1999,). Die cytoplasmatische Lokalisation während der Interphase ist auf eine 42-AS-Region, dem cytoplasmatischen Retentionssignal (CRS), welches sich im N-terminalen Bereich befindet, zurückzuführen. In diesem CRS befindet sich eine leucin-reiche NES-Sequenz. Cyclin B1 wird durch das Exportprotein Crm1 aus den Kern exportiert. Während der Interphase überwiegt der Export, wodurch Cyclin B1/cdk1 cytoplasmatisch lokalisiert und zusätzlich inaktiviert ist. Weder Cyclin B1 noch cdk1 besitzen eine NLS-Sequenz. Cyclin B1 bindet direkt an das Importprotein Importin β und benötigt keine Interaktion mit Importin α . Normalerweise bindet Importin α das zu transportierende Protein (z.B. Cyclin E), welches dann mit Hilfe von Importin β in den Kern gelangt. Dieser Tri-Komplex wird in einer GTP-Ran-abhängigen Weise im Kern getrennt. Cyclin B1 muss ebenfalls mit Hilfe eines nukleären Faktors von Importin β abdissoziieren. Dabei handelt es sich nicht um den bekannten Faktor GTP-Ran. Die Importsequenz, die für die Interaktion mit Importin β verantwortlich ist, ist bisher nicht bekannt. Während des Beginns der Mitose ist Cyclin B1 an vier oder fünf Serin-Resten in dem Bereich der CRS/NES-Region hyperphosphoryliert. Dadurch ist keine Bindung zu Crm1 möglich und Cyclin B1 wird vor dem Export geschützt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Phosphorylierungen in der CRS-Region auch für einen verstärkten Import verantwortlich sind, allerdings nicht durch Importin β . Bei Inhibierung des Exportproteins Crm1 durch Leptomycin B (LMB), akkumuliert Cyclin B1/cdk1, unabhängig vom Phosphorylierungsstatus, im Kern.

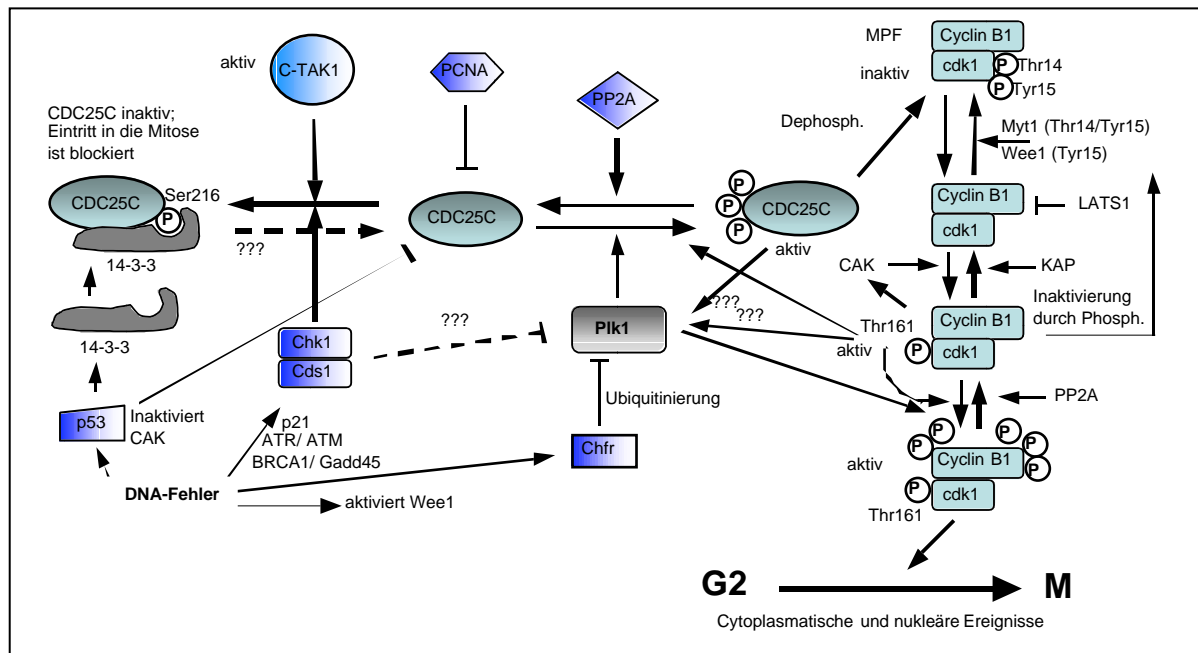


Abb.1.4 Molekulare Mechanismen zur Kontrolle der Aktivierung des Cyclin B1/cdk1-Komplexes zu Beginn der Mitose

CDC25C wird an der AS Ser216 durch C-TAK1 und den Kinasen Chk1 und Cds1, die durch DNA-Schäden aktiviert werden, phosphoryliert und durch Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen inaktiviert. Die Dephosphorylierung an Ser216 der CDC25C-Phosphatase erfolgt nach einem bisher unbekannten Mechanismus. CDC25C benötigt eine Hyperphosphorylierung am N-Terminus, welches durch Plk1 und cdk1 selbst bewerkstelligt wird, um vollständig aktiv zu werden. Die Dephosphorylierung wiederum erfolgt durch die Phosphatase PP2A. CDC25C kann sowohl durch Reprimierung der Expression durch p53 als auch durch Interaktion mit anderen Proteinen inaktiviert werden (PCNA). Plk1 kann nach DNA-Schädigung durch Ubiquitinierung dem 26S-Proteasom zugeführt werden. Der Cyclin B1/cdk1-Komplex wird durch Myt1 und Wee1 im inaktiven Status gehalten. Durch Interaktion mit cdk1 verhindert LATS1 die Cyclin B1/cdk1-Komplexbildung. Die Aktivierung von Cyclin B1/cdk1 fängt mit der Dephosphorylierung durch CDC25C an. Für weitere Aktivierungen ist die Kinase CAK (Thr161), Cyclin B1/cdk1 selbst und Plk1 verantwortlich. KAP ist der Antagonist von CAK. Der aktivierte Komplex ist in der Lage, sowohl CDC25C zu phosphorylieren und so selbst zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus beizutragen, als auch die Wee1-Kinase durch Phosphorylierung zu inaktivieren. Der letztendlich hyperphosphorylierte Cyclin B1/cdk1-Komplex akkumuliert im Nukleus und initiiert die Mitose. Allerdings werden zuvor auch cytoplasmatische Ereignisse wie Centrosomen-Separation und Golgi-Umlagerung initiiert. Die Lokalisation der verschiedenen Proteine ist nicht berücksichtigt. MPF: engl.: maturation promoting factor; ???: bisher nicht geklärt.

Neben all diesen Regulationsmechanismen spielen Effekte auf die Transkription, sowie Interaktionspartner eine wichtige Rolle. So ist CDC25C auf transkriptioneller Ebene durch den Zellzyklus-Inhibitor p53 reprimierbar (Krause *et al.*, 2001). Durch p53 wird die Expression von sowohl Gadd45, welches die Cyclin B1/cdk1-Kinase inhibiert (Zhan *et al.*, 1999), als auch die Expression des inhibitorischen p21-Proteins erhöht. Der Inhibitor p21 kann den Zellzyklus sowohl am G₁-Kontrollpunkt als auch am G₂-Kontrollpunkt zu Gunsten der DNA-Reparatur durch Inaktivierung von cdk1 arretieren (el-Deiry *et al.*, 1993). Sowohl Gadd45 als auch die Chk1-Kinase (aktiviert nach DNA-Schäden) werden durch das Tumorsuppressor-Protein BRCA1 (engl.: breast cancer susceptibility gene) hochreguliert (Mullan *et al.*, 2001;

Yarden *et al.*, 2002). Weiter interagiert z.B. LATS1 mit cdk1 und inhibiert dadurch die Komplexbildung von Cyclin-B1/cdk1 (Yang *et al.*, 2001). Neben C-TAK1 können auch noch weitere Proteine mit CDC25C interagieren. So ist z.B. das PCNA-Protein (engl.: **p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen) dazu befähigt, mit den AS 1-40 der CDC25C-Phosphatase zu interagieren und deren Aktivität zu verringern. Ob dieses auf ein Phosphorylierungs- oder Transportphänomen zurückzuführen ist, ist bisher ungeklärt (Kawabe *et al.*, 2002, Abb.1.4). PCNA wird wiederum von p21 und durch eine weitere posttranslationale Modifikation reguliert (Hoegge *et al.*, 2002; Waga *et al.*, 94).

Bisher ungeklärt ist ebenfalls die Tatsache, ob Cyclin B1/cdk1 im Kern oder im Cytoplasma aktiviert wird, bzw. bei welchem Aktivierungsstatus die Akkumulation im Kern erfolgt. So spricht die Centrosomen-Separation und die Umlagerung des Golgi-Apparates für eine Aktivierung im Cytoplasma, während ein ultrasensitiver Mechanismus für die Aktivierung im Kern spricht. Dabei geht man davon aus, dass positive Rückkopplungsmechanismen erst über einen bestimmten Schwellenwert stark genug sind, um z.B. eine verfrühte Mitose zu vermeiden.

1.2. Maligne Entartung von Zellen

Die Aufgabe einer Zelle ist es, das komplexe Zusammenspiel zwischen Differenzierung, Proliferation und Apoptose in einem präzisen Gleichgewicht zu halten. Die Zelle ist dabei exogenen Faktoren ausgesetzt, auf die sie mit unterschiedlichen Signalkaskaden reagieren kann. Infolge von Mutationen kann dieses empfindliche Gleichgewicht gestört werden. Im zeitlichen Verlauf kann es zur Anhäufung von unterschiedlichen Mutationen im Genom kommen, wodurch interne Kontrollpunkte ausgeschaltet werden können. Die Deregulation auf jeder Ebene der Signaltransduktion kann zu genetischer Instabilität führen. Die Zelle ist in dieser Situation nicht mehr in der Lage, DNA-Schäden zu erkennen bzw. zu reparieren und weiterführend die Apoptose einzuleiten (Weinert *et al.*, 1998). Zur malignen Transformation kommt es schließlich, wenn Zellen einen außer Kontrolle geratenen Zellzyklus durchlaufen und sich ungehemmt teilen können.

Fehlregulationen genetischen Ursprungs können in Form von Translokation (veränderte Umgebung des Gens), Punktmutationen oder Deletionen auftreten. So gerät beispielsweise das *c-myc*-Gen durch eine t(8:14) Translokalisierung im Burkitt-Lymphom unter Kontrolle des Verstärker-Elementes (engl.: enhancers) des IgM-Lokus (μ -Enhancer). Die spezifische Überexpression des c-Myc-Proteins zieht eine Deregulation der Zellzyklusprogression nach sich, was zu einer unkontrollierten Proliferation beiträgt (Gaidano und Dalla-Favera, 1993).

Im humanen Organismus müssen fünf bis sechs Gene mutiert vorliegen, damit eine maligne Transformation entsteht (Peto *et al.*, 1975). Die Ursache ist in der Redundanz der verschiedenen Sicherungsmechanismen zu suchen. Die verschiedenen Signalkaskaden für Differenzierung, Proliferation und Apoptose setzen sich aus verschiedenen Proto-Onkoproteinen zusammen, weisen aber auch eine Vielzahl von Überlagerungen auf. Eine Zelle ist oft in der Lage, den Ausfall eines Proteins durch den Einsatz anderer Proteine zu kompensieren. Bei weiteren Mutationen in anderen Signalwegen kommt es zu einer Anhäufung von Kontrollverlusten und schließlich zur malignen Transformation. Bei genetischer Prädisposition kann sich dieser Vorgang wesentlich beschleunigen.

Proteine, die im Zellzyklus und/oder in der Signaltransduktion involviert sind und durch Deregulation einen malignen Phänotyp verursachen, werden als Proto-Onkogene bezeichnet. Bei den Zellzyklusproteinen handelt es sich größtenteils um Proteine, die am G₁/S-Übergang involviert sind. So gelten neben Ras und Myc ebenfalls Cyclin D1, Cyclin E, CDC25B und E2F als Onkogene (Geisen und Möröy, 2002; Haas *et al.*, 1997; Johnson, 2000; Karsunky *et al.*, 1999; Rodriguez-Puebla *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 1999).

Tumorsuppressorgene sind solche Gene, deren Funktionsverlust die Tumorentstehung fördert. Eine der am häufigsten auftretende Mutation betrifft das Tumorsuppressorgen p53 (Hollstein *et al.*, 1991; Vogelstein, 1990). Das p53-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der als Multimer an die DNA der zu regulierenden Gene binden kann. Ist nur ein p53-Allel mutiert, kann das daraus resultierende mutierte Protein andere p53-Proteine inaktivieren. Dieses bezeichnet man als transdominante Mutante (Shaulian *et al.*, 1993). Somit ist die proliferationshemmende Wirkung nicht mehr gewährleistet (Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993). Ein weiteres Beispiel ist das Retinoblastoma-Protein, welches eine entscheidende Rolle in der Zellzyklusregulation der G₁/S-Progression übernimmt (Adams und Kaelin, 1998). So gelten auch viele der CKIs als potentielle Tumorsuppressoren. Allerdings zeigte in den untersuchten Tumoren nur p16 eine hohe Mutations- oder Inaktivierungsrate (Hall und Peters, 1996; Hiram und Koeffler, 1995; Kamb *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1994). Aber gerade die CKIs (oder auch p53) werden durch die viralen Onkoproteine E6/E7 des HPV-Virus (engl.: **h**uman **p**apilloma **v**irus) inaktiviert (Funk und Galloway, 1998). Ein anderer Mechanismus ist die erhöhte Expression eines anti-Apoptose-Proteins (z.B. Bcl-2/ Gaidano und Dalla-Favera, 1993; Hunter, 1997). Durch die Inhibierung der Apoptose hat die Zelle keine Wahl und differenziert oder proliferiert weiter.

1.2.1. Identifizierung von Proto-Onkogenen durch retrovirale Mutagenese

Durch Infektion von Mäusen mit einem nicht akut transformierenden Retrovirus (z.B. MoMuLV-Virus (**M**oloney **M**urine **L**eukemia **V**irus)), dessen Genom kein Onkogen enthält, konnten Gene isoliert werden, die in der malignen Transformation von T-Zellen involviert sind (retrovirale Mutagenese). Man konnte durch die provirale Insertion der DNA mit ihren starken transkriptionsaktivierenden Sequenzen in lymphoiden Neoplasien Onkogene isolieren, die entweder mutiert oder aktiviert waren (Cuypers *et al.*, 1984 und 1986; Selten *et al.*, 1985 und 1986). Bei den am häufigsten identifizierten retroviralen Zielgenen handelte es sich um *c/N-myc* (Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor), *Cyclin D1/D2* (Zellzyklus-Regulatoren), *Pim-1* (Serin/Threonin-Kinase) und *Gfi-1* (Zink-Finger Transkriptionsfaktor). Durch die provirale Insertion werden diese transkriptionell aktiviert. Die Überexpression der Proteine ist an der Bildung von T-Zell-Lymphomen beteiligt. Dieses konnte in Studien mit transgenen Mäusen eindeutig gezeigt werden (Möröy *et al.*, 1991; Scheijen *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1996; Selten *et al.*, 1984; van Lohuizen *et al.*, 1989 und 1991; Zornig *et al.*, 1996). Durch Herstellung transgener Mäuse konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Pim-1, Myc und Gfi-1 in jeder Kombination miteinander in der Tumorgenese kooperieren (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998a; Zornig *et al.*, 1996). Pim-1 gehört in eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen (Friedmann *et al.*, 1992; Padma und Nagajaran, 1991; Saris *et al.*, 1991). Weitere Mitglieder sind Pim-2 und Pim-3, die wahrscheinlich ähnliche Funktionen wie Pim-1 ausüben (Baytel *et al.*, 1998; Breuer *et al.*, 1989; Eichmann *et al.*, 2000; van der Lugt *et al.*, 1995). So kann z.B. Pim-2 die Funktion von Pim-1 in *Pim-1*-defizienten Mäusen übernehmen (van der Lugt *et al.*, 1995). Weiter wurde auch *Pim-2* als provirale Integrationsstelle gefunden. Pim-2 kann ebenso wie Pim-1 zur Entstehung lymphoider Tumore beitragen (Allan *et al.*, 1997; Breuer *et al.*, 1989). Die physiologische Rolle der Serin/Threonin-Kinase Pim-1 blieb dabei allerdings im Unklaren.

1.3. *Pim-1* als Onkogen

Das *Pim-1*-Gen wird in hämatopoetischen Organen wie Thymus, Milz und fötaler Leber aber auch im Hoden exprimiert (Padma und Nagajaran, 1991; Saris *et al.*, 1991) und kodiert für zwei Protein-Kinasen, die durch alternative Initiation eines ATG (34 kD, 313 AS) und eines CTG (44 kD) gebildet werden. Letztere konnte in humanen Geweben bisher allerdings nicht nachgewiesen werden. Pim-1 besitzt eine typische Kinase-Domäne, einen Phosphat-Anker und ein aktives Zentrum. Das bisher gefundene Pim-1-Phosphorylierungs-Konsensus-Motiv ist (K/R)₃-X-S/T-X. Dabei ist X weder eine basische noch eine große hydrophobe AS

(Friedmann *et al.*, 1992). Pim-1 ist in der Lage sich zu autophosphorylieren, besitzt selbst aber kein Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv (Palaty *et al.*, 1997a und 1997b).

1.3.1. Pim-1 ist ein direktes Zielgen des JAK/STAT-Signalweges

Die Pim-1 Expression kann durch Zytokine aktiviert werden (Borg *et al.*, 1999; Buckley *et al.*, 1995; Demoulin *et al.*, 1999; Horseman, 1995; Jaster *et al.*, 1999a und 1999b; Matikainen *et al.*, 1999; Shirogane *et al.*, 1999; Yip-Schneider *et al.*, 1995). Dabei ist die Induzierung durch IL-2, IL-3, IL-6, IL-7 und Prolaktin am besten untersucht. Die Signale der oben genannten Zytokine werden von dem JAK/STAT-Signalweg (engl.: **J**anus **K**inase, **S**ignal transducer and **a**ctivator of **t**ranscription) durch die Aktivierung von STAT5 weitergeleitet (Abb.1.5; Buckley *et al.*, 1995; Demoulin *et al.*, 1999; Matikainen *et al.*, 1999; Jaster *et al.*, 1999b; Temple *et al.*, 2001; Kawashima *et al.*, 2001). Pim-1 wird ebenfalls über weitere Stimuli wie z.B. GM-CSF (Lehtonen *et al.*, 2002) oder über BCR/ABL und STAT5 (Nieborowska-Skorska *et al.*, 2002; Nosaka und Kitamura, 2002) aktiviert. STAT3 wird durch die Zytokine IL-2, IL-5, IL-6, IL-11, Interferon γ und G-CSF aktiviert (Jaster *et al.*, 1999a; Matikainen *et al.*, 1999; Narimatsu *et al.*, 2001, Shirogane *et al.*, 1999). STAT3 und STAT5 binden direkt an die Promotor-Elemente des *Pim-1* Gens (Borg *et al.*, 1999). Expression von dominant-negativen *Pim-1*-Allelen unterlaufen die durch STAT3-vermittelte Aktivierung und inhibieren die Zytokin-vermittelten Effekte (Shirogane *et al.*, 1999). Das Tumorsuppressor-Protein p53 reduziert die STAT3-Phosphorylierung und sorgt so für die Reprimierung der STAT3-Zielgene (Lin *et al.*, 2002). Aktivierte STAT-Proteine können wiederum auch von Pias-Proteinen (engl.: **P**rotein **i**nhibitor of **a**ctivated **S**TAT) inhibiert werden, was dementsprechend zu einer Reprimierung der STAT-Zielgene führt. Der Transkriptionsfaktor Gfi-1 kann durch Interaktion mit Pias3 selbiges inaktivieren und so den STAT3-Signalweg verstärken (Chung *et al.*, 1997; Rödel *et al.*, 2000) (Abb.1.5). In letzter Zeit wurden Hinweise gefunden, dass Pias-Proteine die E3-Ligase-Funktion für einen neuartigen SUMO-Signalweg übernehmen (ähnlich dem Ubiquitin-Signalweg), in dem Proteine posttranslational modifiziert werden (z.B. p53; Jackson, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Sachdev *et al.*, 2001; Schmidt und Muller, 2002). NF κ B ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von Pim-1 z.B. in B-Zellen erhöht (Zhu *et al.*, 2002).

Pim-1 defiziente Mäuse zeigen eine Störung in der IL-3 und IL-7 abhängigen Proliferation von Mast- und prä-B-Zellen im Knochenmark (Domen *et al.*, 1993a, 1993b und 1993c). Pim-1 besitzt einen Einfluss sowohl auf die Apoptose, als auch auf die Zellproliferation und Differenzierung. Die anti-apoptotische Wirkung ist in unabhängigen experimentellen Systemen in einer Reihe von Veröffentlichungen direkt oder indirekt bewiesen worden (Lilly und Kraft, 1997; Lilly *et al.*, 1999; Nosaka *et al.*, 1999; Pircher *et al.*, 2000;

Shirogane *et al.*; 1999, Wang *et al.*, 2001). So spielt Pim-1 in der frühen T-Zell-Entwicklung, der sogenannten β -Selektion im Thymus, eine entscheidende Rolle (Jacobs *et al.*, 1999; Leduc *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1998b). Eine Überexpression des Pim-1-Proteins in *E μ Pim-1* transgenen Mäusen führte zu einer erhöhten Zellzyklusprogression in den doppelt negativen T-Zellen. In *Pim-1* transgenen und *Rag1* defizienten Mäusen ist Pim-1 in der Lage, den durch Verlust des Rag1-Proteins verursachten Block in der CD4⁺/CD8⁻-Population teilweise aufzuheben. In diesem System können CD4/CD8 doppelt-negative Zellen auch ohne TCR- β -Kette zu CD4/CD8 doppelt positiven Zellen ausreifen (Leduc *et al.*, 2000).

1.3.2. Pim-1-Substrate und interagierende Proteine

Pim-1 kann durch Phosphorylierung die Aktivität des G₁-Regulators CDC25A erhöhen (Mochizuki *et al.*, 1999, Abb.1.4b). Diese Interaktion wurde in GST-Interaktions-Experimenten mit Rat-1-Zellen entdeckt. Somit könnte Pim-1 eine Funktion als positiver Regulator der Zellzyklusprogression einnehmen. Durch das klassische Hefe-Interaktions-Experiment (engl.: Yeast-two-Hybrid-System) wurden inzwischen einige weitere Proteine als Pim-1-Interaktionspartner isoliert. So wird Pim-1 durch die Interaktion mit einem nukleären Adapterprotein p100 eine transkriptionelle Regulation über c-myc zugeschrieben (Levenson *et al.*, 1998; Pearson und Weston, 2000). Ein weiterer Bindungspartner ist das Protein HP-1 (**H**eterochromatin associated **p**rotein **1**), welches Heterochromatin bindet (Koike *et al.*, 2000). Man nimmt für HP-1 eine Rolle bei der Repression der Transkription durch Chromatin-Modulierung (engl.: Chromatin-Silencing) an. Weiter phosphoryliert Pim-1 den Transkriptionsfaktor NFAT (Rainio *et al.*, 2002). Diese Befunde unterstützen die Funktion von Pim-1 bei der Transkriptionskontrolle. Ein sogenanntes SOCS1-Protein (**S**uppressor of **c**ytokine **s**ignaling), welches im JAK/STAT-Signalweg mitwirkt, soll durch Phosphorylierung stabilisiert werden (Chen *et al.*, 2002). TRAF2/SNX6 ist ein weiteres Protein, das an Pim-1 binden kann, welches im klassischen Hefe-Interaktions-Experiment identifiziert werden konnte. Die Bindung an Pim-1 erlaubt TRAF2/SNX6 eine Translokation vom Cytoplasma in den Nukleus (Ishibashi *et al.*, 2001). Welche Funktion Pim-1 über die Interaktion mit Pap-1 (engl.: Pim-1 binding protein) ausübt, ist noch unklar, da es sich bei Pap-1 um ein noch nicht beschriebenes Protein handelt (Maita *et al.*, 2000). Der anti-apoptotische Effekt von Pim-1 könnte durch die Interaktion mit der Tyrosin-Phosphatase PTP-U2S erklärt werden. Diese wird mittels Phosphorylierung durch Pim-1 inaktiviert (Wang *et al.*, 2001). Die Entdeckung, dass Pim-1 mit dem NuMA-Protein interagiert (engl.: **n**uclear **m**itotic **a**poptosis **p**rotein), welches für den Aufbau des Spindelapparates in der Mitose verantwortlich ist, verdeutlicht, dass Pim-1 auch eine Funktion in der späten G₂-Phase und Mitose ausüben kann (Bhattacharya *et al.*, 2002). Andererseits

wurde bis jetzt nur in einer Publikation gezeigt, dass ein Protein einen Effekt auf die Pim-1-Stabilisierung ausübt. Dabei handelt es sich um das Hsp90-Protein (engl.: **Heat-Shock-protein 90**), welches durch Unterstützung der Proteinfaltung zur Stabilisierung von Pim-1 beitragen soll (Mizuno *et al.*, 2001).

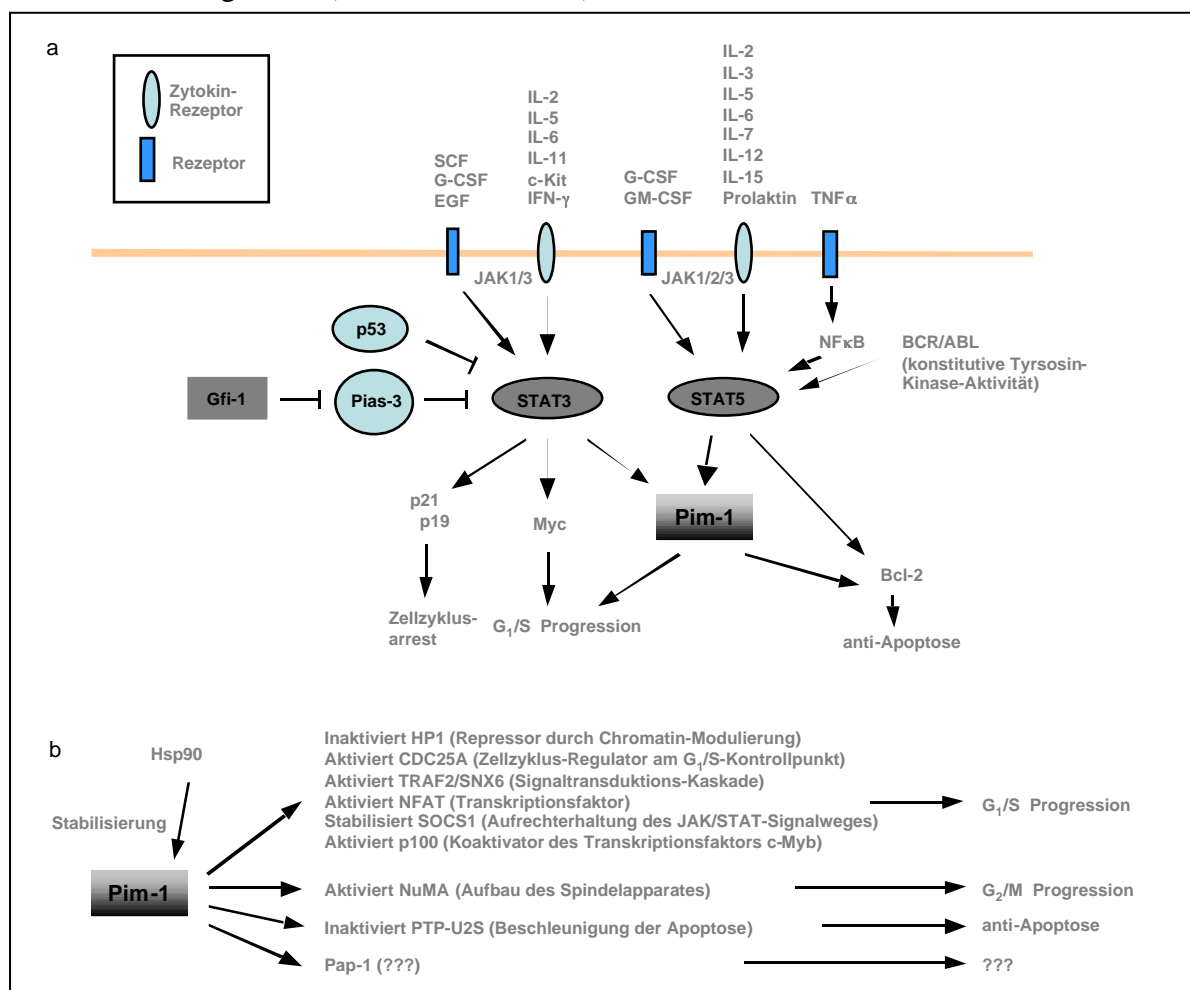


Abb.1.5. Schematische Darstellung der Pim-1-Aktivierung und der bekannten Pim-1-Funktionen

a: Die Expression von Pim-1 wird durch die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5 direkt reguliert. In der Promotorregion des *Pim-1*-Gens befinden sich STAT-Bindeelemente. Die STATs werden durch eine Vielzahl von Stimuli, wie Interleukine (IL) oder Wachstumsfaktoren, über den JAK-Signalweg aktiviert. Von STAT3 ist auch die reprimierende Regulierung durch p53 und Pias3 bekannt. Pias3 wird durch den Transkriptionsfaktor Gfi-1 reprimiert. Pim-1 ist durch Phosphorylierung von Substraten in der Lage, die Zellzyklus-Progression zu beschleunigen bzw. Apoptose-induzierende Faktoren zu inaktivieren. b: Dargestellt sind die zur Zeit bekannten Interaktionspartner von Pim-1 und deren Funktionen. Die Phosphorylierung durch Pim-1 ist verantwortlich für die Inaktivierung von Repressoren, für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bzw. regulatorischer Proteine, für die Stabilisierung von Proteinen, die in Signaltransduktionswegen involviert sind und für die Inaktivierung Apoptose-induzierbarer Proteine.

In Biochip-Expressions-Analysen wurde gezeigt, dass Pim-1 nicht immer in verschiedenen Tumoren überexprimiert wird. So konnte gezeigt werden, dass Pim-1 bei einer bestimmten Mundkrebsart reprimiert (engl.: oral cavity cancer; Alevizos *et al.*, 2001) und in Prostata-Karzinomen überexprimiert wird (Dhanasekaran *et al.*, 2001). Das p53-Protein ist in

Prostata-Karzinomen für die Expression von konstitutivem STAT3-verantwortlich, einem Transaktivator von Pim-1 (Lin *et al.*, 2002).

Durch Sequenzierung der DNA in B-Zell-Lymphomen, konnte gezeigt werden, dass Pim-1 hypermutiert ist (Pasqualucci *et al.*, 2001).

1.4. Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Promotionsarbeit war es, mit Hilfe von Verfahren der Hefe-Interaktionsklonierung neue Interaktionspartner und Substrate von Pim-1 zu identifizieren, um die physiologischen Funktionen von Pim-1 aufzuklären. Zu Beginn dieser Arbeit war nur die Interaktion mit CDC25A bekannt. Diese Interaktion konnte allerdings bis heute in keinem herkömmlichen Hefe-Interaktions-Experiment reproduziert werden. Dieses lässt vermuten, dass bestimmte Interaktionen nur in bestimmten Systemen gefunden werden können. Alle anderen Interaktions-Partner wurden in den letzten beiden Jahren identifiziert. Das klassische Hefe-Interaktions-System beruht auf transkriptioneller Aktivierung, d.h. es macht sich Protein-Interaktionen zunutze, die im Zellkern stattfinden. Im Falle von Pim-1 konnten potentielle Substrate isoliert werden (p100, TRAF2/SNX6, SOCS-1, PAP-1, HP-1), von denen jedoch keins ein abschließendes Modell für Pim-1-Funktionen nach Zytokineinwirkung liefern konnte.

Um den genauen Wirkmechanismus von Pim-1 aufzuklären, sollte zunächst ein neuartiges Hefe-Interaktions-System (engl.: RRS, **R**as-**R**ecruitment-**S**ystem) mit einer cDNA-Bibliothek der Ratte durchgeführt werden, welches die Isolierung möglicher Interaktionspartner erlaubt. Als "Köder" wurde dazu das im Menschen exprimierte kurze Pim-1-Protein verwendet (34 kD). Das neuartige RRS-System basiert auf der Aktivierung des mitogenen Ras-Signalweges und ist dementsprechend im Cytoplasma lokalisiert (Aronheim *et al.*, 1997;; Broder *et al.*, 1998; Hubsman *et al.*, 2001; Maroun und Aronheim, 1999). Dieses System war im Labor etabliert und auch von anderen Gruppen schon erfolgreich eingesetzt worden (Aronheim *et al.*, 1998; Lipinski *et al.*, 1999).

Für das Interaktionsexperiment wurde eine temperatursensitive Hefemutante verwendet, welche durch eine Mutation bei einer Temperatur von 25 °C wachsen kann, aber nicht bei der restriktiven Temperatur von 36 °C (CDC25-2). Das inaktive Hefe-Ras-Protein (Ras-GDP) wird durch den Ras-Guanyl-Nukleotid-Austausch-Faktor CDC25-2 zum aktiven Ras-GTP umgewandelt. Bei 36 °C ist das Wachstum blockiert, da Ras-GDP inaktiv bleibt. Das "Köder"-Protein wird durch Fusion mit einem konstitutiv aktiven Ras exprimiert (Abb.1.6). Das humane Ras-Protein wird aktiv, wenn es an die Plasmamembran rekrutiert wird. Die Expressions-Gen-Bibliothek befindet sich in einen Hefe-Vektor, der das v-src-Myristylierungssignal als Fusion mit jeder Sequenz aus der Bibliothek exprimiert. Die

Expression steht unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors. Somit ist gewährleistet, dass die durch Galaktose induzierten Bibliotheks-Gene Proteine bilden, die an der Plasmamembran lokalisiert sind. Findet eine Interaktion zwischen Bibliotheks- und "Köder"-Protein statt, gelangt das humane konstitutiv aktive Ras an die Cytoplasmamembran und aktiviert dort das Ras-abhängige Signal. Da in der Bibliothek auch SOS und Ras-Proteine enthalten sind, die bei Expression auf Galaktose an der Plasmamembran lokalisiert sind, wurde das Interaktions-Experiment in Anwesenheit von GAP durchgeführt. Der GAP-Austauschfaktor inaktiviert sowohl die mit Hilfe der c-DNA-Bibliothek exprimierten als auch die endogenen aktiven Ras bzw. SOS-Proteine durch einen GTP/GDP-Austausch. Das humane konstitutiv aktive Ras-Protein ist davon nicht betroffen.

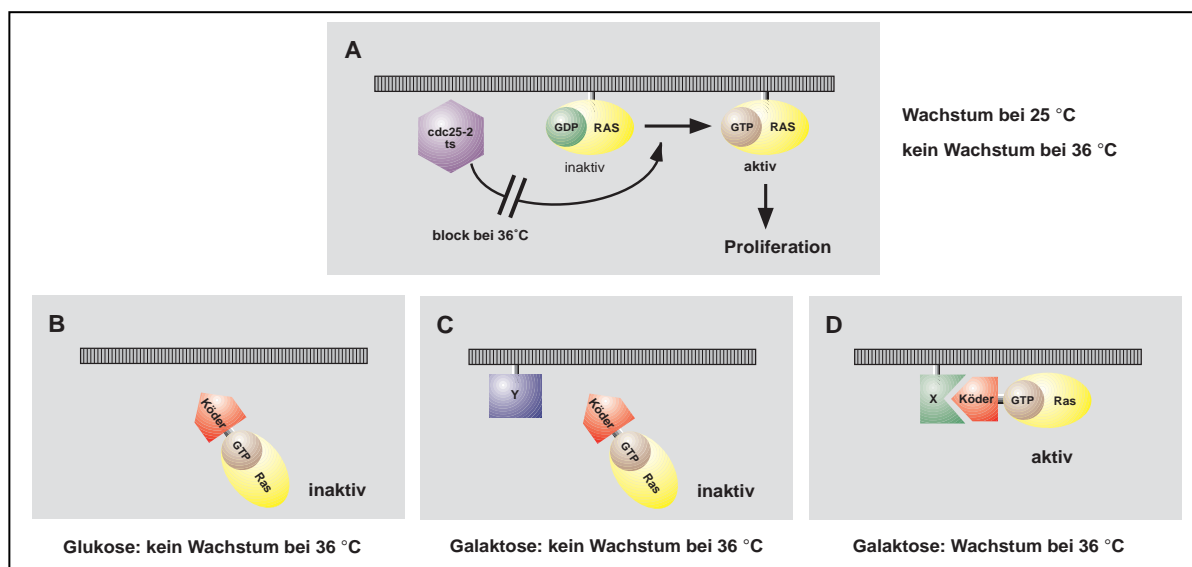


Abb.1.6 Schematische Darstellung des RRS-Systems

a: Membranständiges Ras-GDP wird durch einen GDP/GTP-Austausch durch CDC25-2 zu Ras-GTP aktiviert. Ras-GTP ist für das Anschalten des Ras-Signalweges verantwortlich. Die CDC25-2 temperatursensitive Mutante ist bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inaktiv. b: Das eingesetzte Protein (Köder) wird in einer Fusion mit humanem aktivierten Ras exprimiert. Die Proteine der Bibliothek werden auf Glukose nicht exprimiert. Der temperatursensitive Austauschfaktor CDC25-2 ist bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inaktiviert. Die Hefe-Zellen können nicht wachsen, da der Ras-Proliferations-Signalweg nicht angeschaltet ist. c/d: Die Bibliotheks-Proteine werden auf Galaktose exprimiert und sind durch das v-src-Myristylierungssignal an der Plasmamembran lokalisiert. Interagiert das Bibliotheks-Protein (Y) nicht mit dem Köder-Ras-Fusions-Protein, gelangt Ras nicht in die Nähe der Plasmamembran und das Wachstum ist gehemmt, da der Austauschfaktor CDC25-2 bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inaktiviert ist. Interaktion zwischen dem Bibliotheks-Protein (X) und dem Köder-Ras-Protein führt zur Membranlokalisierung von Ras, was zu einer Aktivierung des Ras-Signalweges und damit zum Wachstum der Hefen auf Galaktose bei der restriktiven Temperatur von 36 °C führt.

Nach Identifizierung eines Ratten-Proteins sollte das humane Homolog identifiziert und isoliert werden. Im weiteren Verlauf sollte die Interaktion zwischen Pim-1 und seinem Interaktionspartner mit biochemischen und zellbiologischen Methoden untersucht werden, mit dem Ziel, neue Einblicke in die molekularen Mechanismen, die für einen geordneten Ablauf des Zellzyklus notwendig sind bzw. bei dem Prozess der malignen Zellentartung eine Rolle spielen, zu gewinnen.

2. Ergebnisse

Pim-1 ist eine cytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase, die hauptsächlich im hämatopoetischen System exprimiert wird und eine ATP-Bindungsstelle, ein aktives Zentrum und eine Kinase-Homologie-Domäne besitzt. Pim-1 besteht aus 313 AS, resultierend in einem Molekulargewicht von 34 kD (Abb.2.1). Ein AS-Austausch im aktiven Zentrum von Lysin (K) gegen Methionin (M) an Position 67 (K67M) führt zu einer inaktiven Pim-1-Mutante.

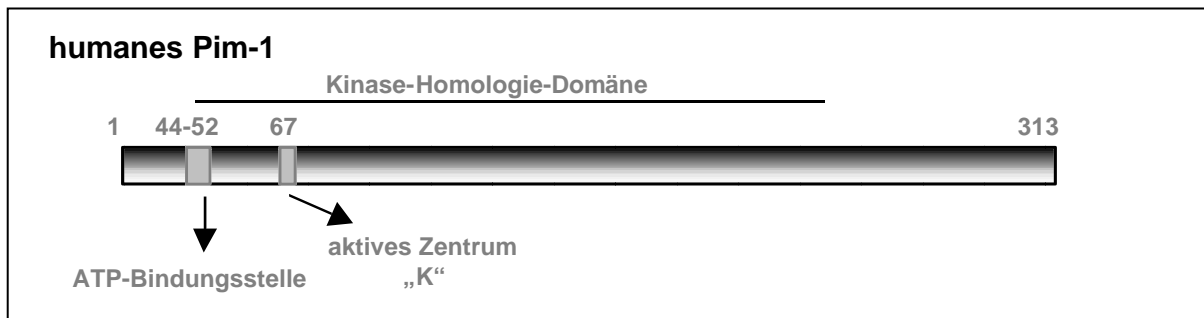


Abb.2.1 Struktur der humanen cytoplasmatischen Serin/Threonin Pim-1-Kinase

Das *Pim-1*-Gen besitzt einen offenen Leserahmen von 942 bp, resultierend in einem Protein mit 313 AS und einem Molekulargewicht von 34 kD. Die Kinase beinhaltet eine ATP-Bindungsstelle, ein aktives Zentrum sowie eine generelle Kinase-Homologie-Domäne. Ein Austausch der AS-Position 67 (K67M) führt zu einer Pim-1-Kinase inaktiven Mutante.

Es ist bekannt, dass Pim-1 in der Tumorgenese mit verschiedenen Proteinen kooperiert. Durch die Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner sollte ein Einblick in die Funktion bei der Regulation der Zellzyklus-Progression erhalten werden.

2.1. Identifikation von Pim-1-Interaktionspartnern mittels eines Hefe-Interaktions-Systems (RRS, engl.: Ras-Recruitment-System)

Um neue Interaktionspartner von Pim-1 zu isolieren und zu charakterisieren, wurde ein Hefe-Interaktions-Experiment durchgeführt. Dabei handelte es sich nicht um das herkömmliche Hefe-System, das auf der Transkription von Selektionsmarkergenen beruht, sondern um ein neuartiges System, in welchem die Protein-Protein-Interaktion im Cytoplasma lokalisiert ist (Aronheim *et al.*, 1997; Broder *et al.*, 1998; Hubsman *et al.*, 2001; Maroun und Aronheim, 1999). Der Vorteil dieses neuartigen Systems besteht darin, dass es in einem anderen Kompartiment lokalisiert ist und dass die Interaktion zwischen dem "Köder"-Protein und dem Bibliotheks-Protein durch das Wachstum der Hefe-Kolonien angezeigt wird. Letztendlich ist die Lokalisation des "Köder"-Ras-Fusions-Proteins von Bedeutung. Dieses befindet sich normalerweise zwar im Cytoplasma, gelangt aber nur an die innere Plasmamembran, wenn es mit einem exprimierten myristylierten Bibliotheks-Protein (Galaktose-induzierbar) bei der restriktiven Temperatur von 36 °C interagiert. Bei dieser

Temperatur ist das hefe-eigene CDC25-2-Protein inaktiv. Auf Glukose werden die Bibliotheks-Proteine nicht exprimiert.

Bei der verwendeten Bibliothek handelte es sich um eine Hypophysen cDNA-Bibliothek der Ratte (GC1-Tumorzelllinie, GC1-B1-6; Hanjo Hennemann, unveröffentlicht). Die cDNA wurde gerichtet im Leserahmen in den Vektor YesMdpA inseriert, welcher ein Myristylierungssignal enthält, so dass alle exprimierten Bibliotheks-Proteine an der cytoplasmatischen Membran verankert werden können (Abb.2.2a). Die Gesamtkomplexität der Genbibliothek liegt bei 3,9 Mio. unabhängigen Klonen (83 % rekombinant, 1,7 kb durchschnittliche Fragmentgröße). Zum Durchsuchen der Bibliothek wurde die inaktive Pim-1-K67M Mutante (Pim-1-DEAD) verwendet. Dadurch sollte vermieden werden, dass ein neues Substrat phosphoryliert wird und Pim-1 anschließend abdissoziiert, wodurch die Interaktion als Selektionskriterium verloren ginge. Bei dem "Köder"-Vektor pADNS-RRS handelt es sich um ein Ras Hefe-Expressions-Plasmid, welches für das humane konstitutiv aktive Ras-Protein kodieren kann (Abb.2.2b). Die humane Pim-1-K67M cDNA wurde so in das Plasmid pADNS-RRS eingesetzt, dass der Pim-1-Teil stromaufwärts an die Ras-kodierende Region fusioniert wurde. Auf diese Weise konnte ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 55 kD gebildet werden.

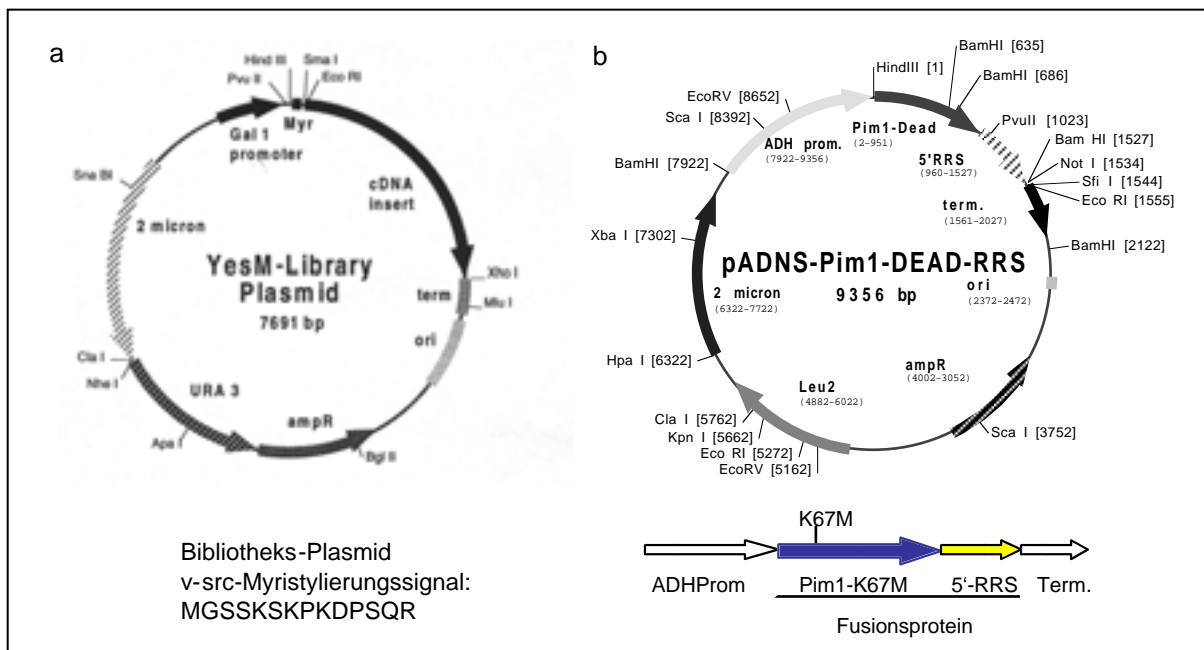


Abb.2.2 Schematische Darstellung der verwendeten Hefepasmide

a: Die von der cDNA kodierten Proteine stehen unter der Kontrolle eines induzierbaren Galaktose Promotors. Die Proteine werden als Fusion mit einem v-src-Myristylierungssignal exprimiert. Der Vektor kodiert für eine Ampicillin-Resistenz und einen auxotrophen Marker URA3 und liegt in Hefen in mehrfacher Kopienzahl vor (2 micron). b: Die Pim-1-K67M-Sequenz wurde stromaufwärts an die Ras-Sequenz des Vektors pADNS-RRS inseriert. Dieser Vektor beinhaltet einen ADH Promotor/Terminator, er kodiert für eine Ampicillin-Resistenz und einen auxotrophen Marker LEU2 und liegt in Hefen in mehrfacher Kopienzahl vor (2 micron). Das Pim-1-K67M-Ras-Fusionsprotein enthält 509-AS und besitzt ein Molekulargewicht von 55 kD (Pim-1-K67M: 34 kD; humanes Ras: 21 kD).

2.1.1. Kontrolle der Bibliothek und des RRS-Systems

Das neuartige Hefe-Interaktions-System wurde mit einem cdk4-"Köder"-Plasmid und einem anderen Cyclin D1-Hefe-exprimierenden Vektor auf seine Zuverlässigkeit erfolgreich überprüft. Um sicher zu gehen, dass im späteren Verlauf Interaktionspartner isoliert werden können, musste gezeigt werden, dass Pim-1 cDNA-Sequenzen in der verwendeten Bibliothek vorliegen. Für diesen Nachweis wurde die PCR angewendet (Oligonukleotide: mPim5, mPim1; Ausgangskonstrukt: 1 µg DNA von jedem Bibliotheks-Aliquot). Das amplifizierte PCR-Fragment beinhaltete nicht das Vollängen Pim-1-Fragment, sondern überspannte die Basenpaare 1-645, da sich die Anlagestelle des 3'-Oligonukleotids im Exon 5, von insgesamt 6 Exons, befindet (Abb.2.3).

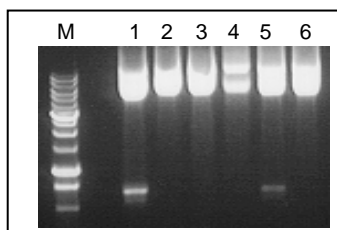


Abb.2.3 Nachweis von Pim-1 in der GC1-Hypophysen-Bibliothek der Ratte mittels PCR

Auf jedem Aliquot der Ratten-Bibliothek wurde eine PCR zum Nachweis von Pim-1 durchgeführt. Die cDNA von Pim-1 ist in den Aliquots GC1-B1 und GC1-B5 enthalten. M: Marker, 1 kB-Leiter.

Nachdem der Hefestamm CDC25-2 mit dem Pim-1-K67M-"Köder"-Plasmid und dem GAP-Plasmid transformiert worden war, konnte die korrekte Expression des Pim-1-Ras-Fusionsproteines in Hefezellen mittels Immunoblot nachgewiesen werden (Abb.2.4). Die Nummern 14/15 stellen unterschiedliche Klone dar. Hefezellen, die mit Jun-Ras transformiert waren, wurden als Negativ-Kontrolle verwendet.

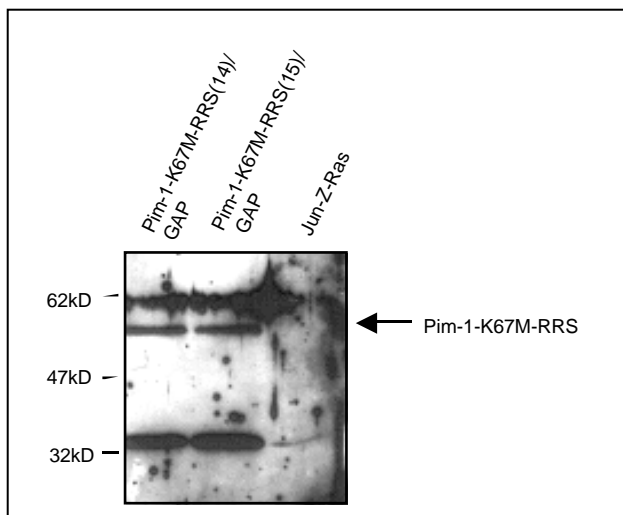


Abb.2.4 Nachweis von Pim-1 in Hefezell-Protein-Extrakten

Der Hefestamm CDC25-2 wurde mit Plasmiden, die für Pim-1-K67M-RRS und GAP kodieren, transformiert. Nach Isolierung und Animpfen der Klone wurde 1/10 der gesamten Proteinpräparation auf einem SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Für den immunologischen Nachweis des Pim-1-Fusionsproteins wurde ein Pim-1-Antikörper (AK) verwendet. Pim-1 konnte in beiden Hefezell-Protein-Extrakten nachgewiesen werden. Jun-Z-Ras: Negativ-Kontrolle; 14 und 15 stellen Pim-1-Klon-Nummern dar.

2.1.2. Suche nach Pim-1-Interaktionspartnern mittels des RRS-Systems

Alle weiterführenden Hefe-Interaktions-Experimente wurden mit dem in 1.1.1. beschriebenen Klon Nr.14 durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass alle cDNAs aus der Bibliothek abgedeckt wurden, wurde das Hefe-Interaktions-Experiment drei Mal durchgeführt. In Abbildung 2.5 ist schematisch das Selektionsschema der Interaktionssuche abgebildet. In allen Durchgängen wurden 300-500 Kolonien isoliert und weiter selektioniert. Es wurden nur solche Klone weiter untersucht, deren Wachstum bei der restriktiven Temperatur abhängig von der Expression des enthaltenen Bibliotheks-Plasmids war.

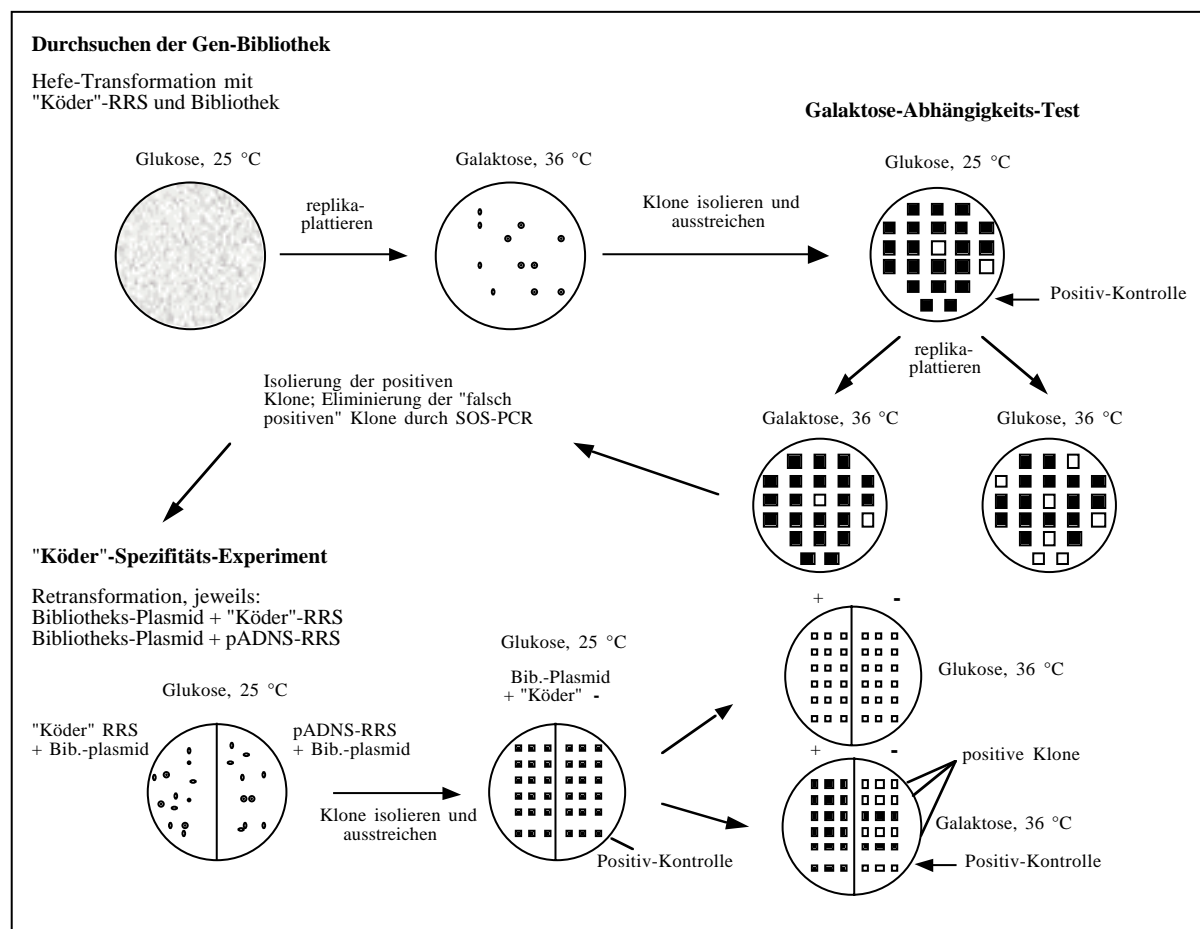


Abb.2.5 Schematische Übersicht des RRS-Systems

Nach der Hefe-Transformation mit dem "Köder"-Plasmid und der Bibliothek wurden die Hefen bei 25 °C auf Glukose inkubiert. Die Klone, die nach dem Replika-plattieren bei 36 °C auf Galaktose gewachsen sind, wurden isoliert und erneut auf Glukose-Platten ausgestrichen. Nach der Inkubation der Klone bei 25 °C wurden die Platten auf Glukose und Galaktose-Platten replika-plattiert und bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inkubiert. Von den positiven Klonen (Wachstum auf Galaktose-Platten bei 36 °C, kein Wachstum auf Glukose-Platten bei 36 °C) wurde das Bibliotheks-Plasmid isoliert. Um "falsch-positive"-SOS-Klone auszuschließen, wurde eine SOS-PCR durchgeführt. Mit weiter positiven Klonen wurde das "Köder"-Spezifitäts-Experiment durchgeführt. Dafür wurden drei Klone isoliert, auf Glukose-Platten ausgestrichen und bei 25 °C inkubiert. Nach Hochwachsen der Klone wurden die Platten auf Glukose und Galaktose-Platten replika-plattiert und bei der restriktiven Temperatur von 36 °C inkubiert. Die Klone, die letztendlich auf Galaktose bei 36 °C nur mit "Köder" wuchsen, repräsentierten die positiven Klone dieses Experiments. Das inserierte DNA-Fragment in dem Bibliotheks-Plasmid wurde sequenziert.

Dies geschah durch Replika-Plattierung auf Galaktose- und Glukose-Platten. Von den positiven Klonen wurde das Bibliotheks-Plasmid isoliert und einer SOS-PCR unterworfen, um die "falsch-positiven" zu eliminieren. Dabei handelte es sich um Proteine, die den Ras-Signalweg direkt aktivieren oder um myristyliertes SOS (GDP/GTP-Austausch Faktoren). Im "Köder"-Spezifitäts-Experiment wurde das isolierte Bibliotheks-Plasmid entweder mit oder ohne "Köder"-Plasmid in den Hefestamm CDC25-2 retransformiert. "Echte" Pim-1-interagierende Proteine sollten den CDC25-2-temperatur-sensitiven Phänotyp nur mit dem Pim-1-"Köder" komplementieren können. Ein schematischer Überblick ist in Abbildung 2.5 gezeigt.

Stellvertretend für die positiven Klone des "Köder"-Spezifitäts-Experimentes ist in Abbildung 2.6 die Interaktion von Pim-1-K67M-Ras und GC-BY6131 gezeigt. In jedem "Köder"-Spezifitäts-Experiment wurden der Leervektor pADNS-RRS mit dem isolierten Klon und das Pim-1-K67M-"Köder"-Plasmid (Pim-1-K67M-Ras) mit dem leeren Bibliotheks-Vektor (pYesMdpA) als Negativ-Kontrollen verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente die bekannte Interaktion zwischen den Proteinen Jun und Fos (Jun-Z-Ras und M-Fos). Der Leervektor pADNS-RRS und M-Fos dienten als Negativ-Kontrolle.

"Köder"	Bibliothek-Plasmid	Glukose, 25 °C	Galaktose, 36 °C	Glukose, 36 °C
Pim-1-K67M-Ras	GC-BY6131			
pADNS-RRS	GC-BY6131			
Pim-1-K67M-Ras	pYesMdpA			
Jun-Z-Ras	M-Fos			
pADNS-RRS	M-Fos			

Abb.2.6 "Köder"-Spezifitäts-Experiment

Mit den nach dem Galaktose-Abhängigkeits-Test noch positiven Klonen wurde das "Köder"-Spezifitäts-Experiment durchgeführt. Pim-1-K67M konnte nur mit dem isolierten Protein GC-BY6131 bei der restriktiven Temperatur von 36 °C auf Galaktose interagieren, da die Hefezellen wachsen konnten. Im Gegensatz dazu konnten die Hefezellen, die entweder nur das Pim-1-K67M-Ras oder nur das isolierte GC-BY6131-Protein enthielten, bei 36 °C auf Galaktose nicht wachsen. Jun und Fos dienten als Positiv-Kontrolle. Der Leervektor pADNS-RRS und M-Fos dienten als Negativ-Kontrolle. Bei 36 °C auf Glukose war die Expression der Bibliotheks-Plasmide reprimiert und es konnten in allen Fällen keine transformierten Hefen wachsen. Die Glukose-Platte bei 25 °C diente als Wachstums-Kontrolle.

Die Interaktion zwischen dem Pim-1-K67M-Ras-"Köder"-Protein und dem isolierten Klon GC-BY6131 bei 36 °C auf Galaktose war deutlich zu sehen. Die ausplattierten Hefen auf der Glukose-Platte, die bei 25 °C wuchsen, dienten als Wachstums-Kontrolle.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Anzahl der durchsuchten Klone in drei unterschiedlichen Experimenten, die Anzahl der positiven Klone in den einzelnen Experiment-Abschnitten, die der aussortierten "falsch-positiven"-SOS-Klone und letztendlich über die am Ende wirklich Interaktions-abhängigen positiven Klone. Nach Sequenzierung der isolierten inserierten DNA-Fragmente aus den Bibliotheks-Vektoren wurden diese mit Hilfe einer Sequenz-Datenbank verglichen. Dabei konnten vier Klone identifiziert werden, die Sequenzen der Serin/Threonin-Kinase C-TAK1 und zwei Klone, die Sequenzen des PKC-Zip-Protein (engl.: **P**rotein-**K**inase **C**-**Z**eta-**I**nteracting **p**rotein) enthielten. Zusätzlich wurden ein Zink-Finger-Proteinanteil und ein unbekanntes Protein KIAA1142 (Accession-Nummer: AB032968) identifiziert.

Durchsuchte Bibliotheks-Klone	Isolierte Klone	Galaktose/ Glukose abhängige Klone	Spezifitäts-Test abhängige Klone	Isolierte Zielproteine
0,657 Mio.	417/angew.401	17 / 2x SOS	1	Zn-Finger-Protein
2,83 Mio.	296/angew.124	38 / 20x SOS	1	C-TAK1
2,73 Mio.	458/angew.417	13/ 2x SOS	6	3x C-TAK1 2x PKC-Zip 1x KIAA1142

Tab.2.1 Ergebnisse der Pim-1-K67M-Hefe-Interaktions-Experimente mit der cDNA-Bibliothek der Ratte (GC1-B1-6)

Gezeigt ist die Anzahl der durchsuchten Bibliotheks-Klone, die isolierten Galaktose-abhängigen Klone, die Anzahl der positiven Klone des Galaktose-Abhängigkeits-Tests, die eliminierte Anzahl der "falsch-positiven"-SOS-Klone und die letztendlich positiven Klone aus dem "Köder"-Spezifitäts-Experiment. In der letzten Spalte sind die dazu gehörigen Proteine aufgeführt.

Da das C-TAK1-cDNA-Fragment am häufigsten in diesem Hefe-Interaktions-Experiment isoliert worden war, zielten die weiteren Arbeiten darauf ab, die Interaktion zwischen Pim-1 und C-TAK1 zu untersuchen. Das isolierte Fragment beinhaltet einen durchgehenden offenen Leserahmen, welcher die Basenpaare 1 bis 789 der C-TAK1-cDNA überspannte. Der 5'-untranslatierte Bereich reichte bis -3. C-TAK1 steht für **CDC-twentyfive-associated kinase1**. C-TAK1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die die Phosphatase CDC25C an der AS Ser216 phosphoryliert und dadurch inaktiviert.

2.2. Pim-1 interagiert mit C-TAK1 ebenfalls im herkömmlichen Hefe-System

Die Interaktion zwischen Pim-1 und C-TAK1, die mit Hilfe des RRS-Systems entdeckt worden war, sollte auch mit dem herkömmlichen Hefe-System bestätigt werden. Dabei wurde Pim-1-K67M an die DNA-bindende Domäne des bakteriellen LexA-Proteins fusioniert. Der LexA-Vektor ist durch Methionin reprimierbar, weswegen darauf geachtet werden musste, dass die Experimente ohne Methionin durchgeführt wurden. Der Hefestamm L40 ist URA3 und LYS2 auxotroph und mit dem *LacZ*-Gen (β -Galaktosidase) stabil transformiert, welches Bindungsstellen für das LexA-Protein besitzt. Die isolierte C-TAK1-Sequenz (C-TAK1-Y6131) wurde stromabwärts an die Transaktivator VP16-Sequenz fusioniert. Der VP16-Vektor ist Galaktose-induzierbar. Durch Wechseln der Kohlenstoff-Quelle, kann die Interaktion zweier Proteine in diesem L40-Hefestamm durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität getestet werden.

Als Negativ-Kontrollen wurde ein LexA-Gfi-G-Protein verwendet, das keine Interaktion mit Pim-1 zeigen sollte. In Abbildung 2.7 ist die Messung der β -Galaktosidaseaktivität gezeigt. LexA-Pim-1-K67M ist selbst nicht transaktivierend (Daten nicht gezeigt).

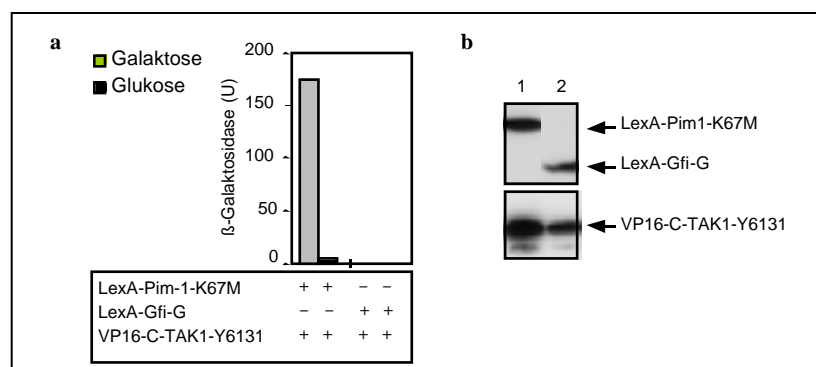


Abb.2.7 Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität durch die Pim-1/C-TAK1-Interaktion

a: y-Achse: relative β -Galaktosidaseaktivität. Gezeigt ist eine deutliche Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität, die durch die Pim-1/C-TAK1-Y6131-Interaktion zustande kommt (Galaktose). Durch Glukose ist die Expression des

VP16-C-TAK1-Y6131-Proteins reprimiert. LexA-Gfi-G diente als Negativ-Kontrolle. b: Immunoblot der verschiedenen LexA-Proteine und des Galaktose-induzierten VP16-Fusion-Proteins. Für den immunologischen Nachweis wurden entweder der LexA- oder der VP16-AK und der entsprechende HRPO (engl.: horseradish-peroxidase) konjugierte 2. AK verwendet.

Dieses Experiment zeigte, dass das in dem RRS-System isolierte C-TAK1-Y6131-Protein auch im herkömmlichen Hefe-System mit Pim-1 interagiert. Während die β -Galaktosidaseaktivität im Falle von Pim-1-K67M und VP16-C-TAK1-Y6131 erhöht wurde, war die induzierte Aktivität bei Verwendung von Pim-1-K67M und Gfi-G vernachlässigbar gering (Abb.2.7a). In Abbildung 2.7b sind die zu Abbildung 2.7a dazugehörigen exprimierten Proteine (Kohlenstoff-Quelle: Galaktose) im Immunoblot nachgewiesen.

2.3. Herstellung einer nicht-interagierenden C-TAK1-Y6131 Punktmutante (Ratte)

Um die für die Interaktion in Hefe von C-TAK1-Y6131 (Ratte) und Pim-1 notwendigen Bereiche im C-TAK1-Protein zu identifizieren, sollte eine C-TAK1-Y6131 (Ratte) Punktmutante (PM) hergestellt werden, die nicht mehr mit Pim-1 interagieren kann. Dieses wurde mittels einer Fehler-PCR, mit dem isolierten C-TAK1-Y6131-Bibliotheks-Plasmid als Matrize, und anschließender Transformation in den Hefestamm CDC25-2 erreicht. Dieser war zuvor schon mit dem Pim-1-K67M-Ras-"Köder"-Protein transformiert worden. Das RRS-System wurde dabei nach nicht wachsenden Hefe-Klonen durchsucht.

Eine PM enthielt einen AS-Austausch von Leucin zu Prolin an der Position 128 (C-TAK1-Y6131-L128P). Diese PM ist in der IV. Untereinheit der Kinase-Domäne von C-TAK1 lokalisiert. Dadurch konnte die Interaktions-Domäne zwischen C-TAK1 und Pim-1 eingegrenzt werden. Zur Bestimmung der Interaktions-Domäne wurden im späteren Verlauf GST-Interaktions- und/oder Kinase-Experimente durchgeführt (Abb.2.15, 2.23, 2.24, 2.25). In Abbildung 2.8 wurden noch zwei weitere veröffentlichte, artifizielle PM wiedergegeben, die die Fähigkeit zur Auto- oder CDC25C Phosphorylierung verloren haben (Peng *et al.*, 1998).

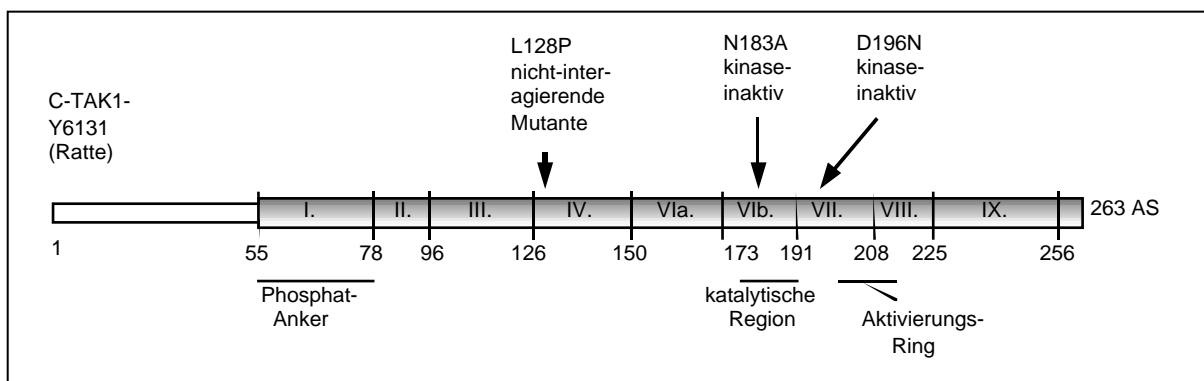


Abb.2.8 Schematische Darstellung der nicht-interagierenden Punktmutante in der C-TAK1-Y6131 Kinase-Domäne

Gezeigt ist das isolierte C-TAK1-Y6131-Fragment der Ratte. Die römischen Ziffern geben die Nummerierung der Kinase-Untereinheiten an. Definiert sind ein Phosphat-Anker, eine katalytische Region und eine Aktivierungsstelle. Sowohl die AS der nicht interagierenden PM L128P aus dem Hefe-System als auch die AS der schon veröffentlichten kinase-defizienten PM N183A und D196N sind gekennzeichnet (Peng *et al.*, 1998).

2.4. Charakterisierung des potentiellen Interaktionspartners C-TAK1-Y6131 (Ratte)

2.4.1. Pim-1 interagiert mit C-TAK1-Y6131 (Ratte) in vitro

Um sowohl C-TAK1-Y6131 und C-TAK1-Y6131-L128P als auch Pim-1-wt/-K67M in eukaryotischen Zellen zu exprimieren und im Immunoblot nachzuweisen, wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen in eukaryotische Expressions-Vektoren inseriert, die die Expression einer cDNA in Fusion mit einem sogenannten "Flag-tag" erlauben. Ein Vektor, der einen großen Teil der Evi5-cDNA enthält, diente als Negativ-Kontrolle (Evi5mut). 24 h nach Transfektion der Flag-Konstrukte C-TAK1-Y6131, Pim-1-wt, Pim-1-K67M, Pias3 und Evi5 in COS7-Zellen wurden die Proteine isoliert und mit ^{35}S -Methionin markierten Pim-1-Protein (IVT, *in-vitro*-Translatat) inkubiert. Das Pim-1-wt-IVT konnte sowohl in dem Komplex mit C-TAK1-Y6131 als auch mit beiden Pim-1-Proteinen kopräzipitiert werden (Abb.2.9). Es stellte sich heraus, dass sich Pim-1 ebenfalls im koimmunopräzipitierten Komplex von dem STAT3-bindenden Protein Pias3 (engl.: **P**rotein **i**nhibitor of **a**ctivated **S**TAT**3**) zu detektieren war. Sowohl das Evi5mut-Protein als auch das IVT Cyclin E dienten als Negativ-Kontrollen.

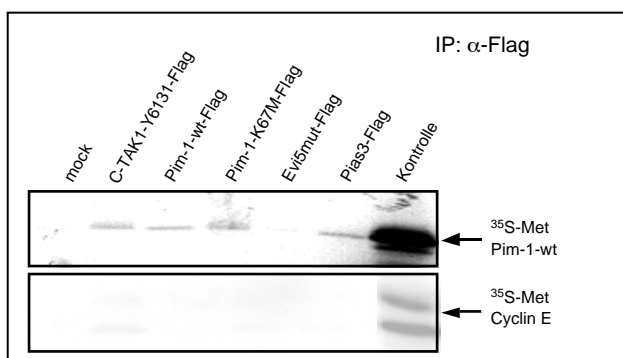


Abb.2.9 C-TAK1-Y6131 ist in der Lage, Pim-1 zu immunopräzipitieren

COS7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und die Proteine nach 24 h isoliert. Das Zellysat wurde entweder mit ^{35}S -Methionin markierten Pim-1-wt oder Cyclin E inkubiert. Die Flag-Proteine wurden mit M2-Agarose immunopräzipitiert und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Autoradiographie konnten die koimmunopräzipitierten IVTs

detektiert werden. Pim-1 interagiert sowohl mit sich selbst als auch mit C-TAK1-Y6131 und Pias3, aber nicht mit Evi5mut.

Weiter wurden COS7-Zellen mit den wie in Abbildung 2.10 angegebenen Plasmiden kotransfiziert, um zu zeigen, dass auch mit zwei in eukaryotischen Zellen exprimierten Proteinen eine Interaktion möglich ist. Dabei konnten sowohl Pim-1-wt als auch die inaktive Mutante Pim-1-K67M (beide nicht Flag-markiert) in den koimmunopräzipitierten Komplexen zum einen von C-TAK1-Y6131-Flag (30 kD) und zum anderen auch von Pias3-Flag (70 kD) nachgewiesen werden. Auch hier diente Evi5mut (74 kD) als Negativ-Kontrolle (Abb.2.10a). In Abbildung 2.10b ist gezeigt, dass sich beide Pim-1-Proteine sowohl in den koimmunopräzipitierten Komplexen von Pias3 als auch von C-TAK1-Y6131 befinden, nicht aber in dem Komplex von der nicht-interagierenden Mutante C-TAK1-Y6131-L128P.

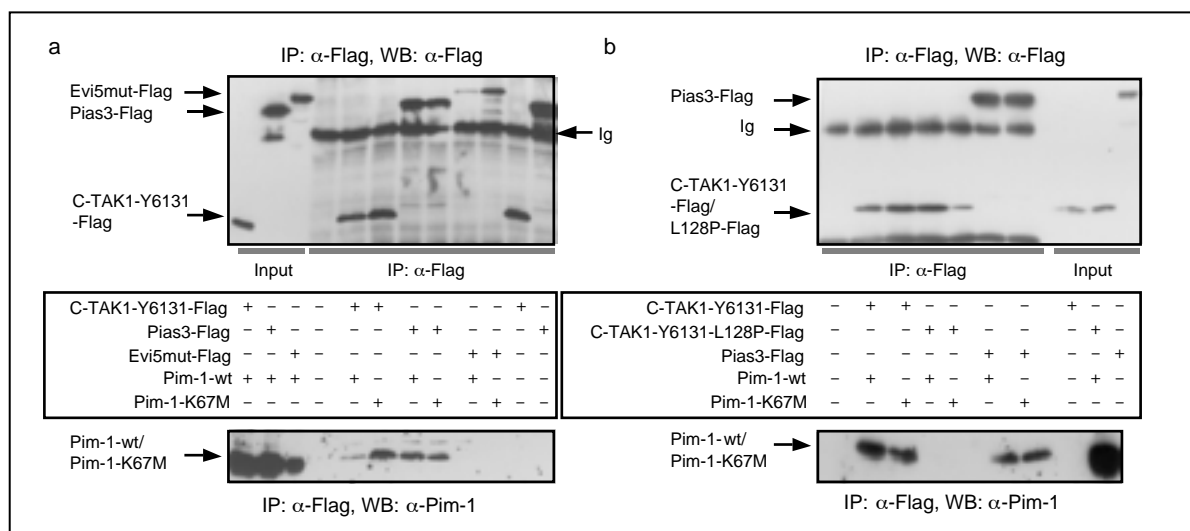


Abb.2.10 Pim-1 interagiert mit C-TAK1-Y6131, aber nicht mit der C-TAK1-L128P-Mutante

COS7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden kotransfiziert und die Proteine nach 24 h isoliert. Die Flag-Proteine wurden mit M2-Agarose immunopräzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Gezeigt sind jeweils die Flag-Kontroll-Immunoblots und die Pim-1-Detektion in den Immunopräzipitaten. Die Proteine wurden mit dem Flag-AK oder Pim-1-AK und dem entsprechenden HRPO-konjugierten 2. AK im Immunoblot analysiert. a: Sowohl Pim-1-wt als auch die inaktive Mutante Pim-1-K67M interagieren mit C-TAK1-Y6131-Flag und Pias3-Flag. Evi5mut-Flag diente als Negativ-Kontrolle. b: Sowohl Pim-1-wt als auch Pim-1-K67M interagieren mit C-TAK1-Y6131-Flag und Pias3-Flag, aber nicht mit der Mutante C-TAK1-Y6131-L128P-Flag. IP: Immunopräzipitation, WB: Immunoblot.

2.4.2. Kolokalisation von Pim-1 und C-TAK1-Y6131 in NIH 3T3-Zellen

Die Interaktion zwischen Pim-1 und C-TAK1-Y6131 wurde auch mittels Immunfluoreszenzstudien untersucht. Dazu wurden NIH 3T3-Zellen mit entsprechenden Flag- und GFP-Konstrukten kotransfiziert und mit einem Laser-Scan-Mikroskop (LSM) photographiert. Die mit nur einem Plasmid transfizierten Zellen dienten als Kontrollen. In Abbildung 2.11a ist gezeigt, dass beide Pim-1-wt und Pim-1-K67M-Proteine sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert sind. Dabei spielte es keine Rolle, ob Pim-1 mit einem Flag oder GFP markiert war. Die Proteine C-TAK1-Y6131/-L128P und Evi5mut sind cytoplasmatisch lokalisiert. GFP besitzt keinen Einfluss auf die Lokalisation. Sobald Pim-1 koexprimiert wurde, konnte C-TAK1-Y6131 auch im Kern detektiert werden und war wie Pim-1 über die ganze Zelle verteilt (Abb.2.11b). Die Überlagerung der Bilder zeigte eine komplette Kolokalisation zwischen Pim-1 und C-TAK1. Dieser Effekt war bei der nicht-interagierenden Mutante C-TAK1-Y6131-L128P nicht zu beobachten. Evi5mut diente als nicht-interagierende Kontrolle in Bezug auf Pim-1.

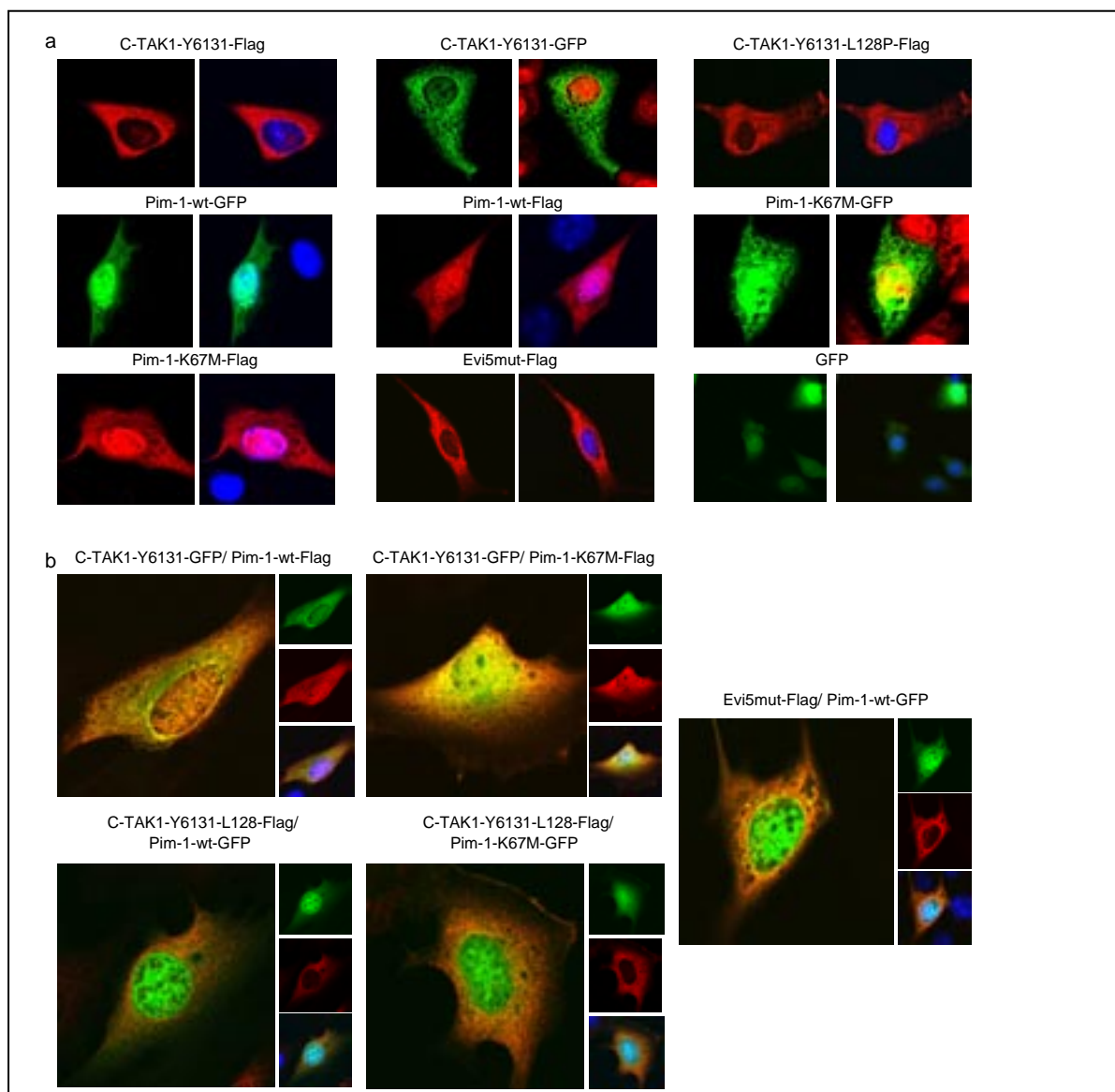


Abb.2.11 Kolokalisation von Pim-1 und C-TAK1-Y6131 in NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3-Zellen wurden mit angegebenen Plasmiden (ko)transfiziert und 48 h später mit Methanol fixiert. a: Gezeigt ist die Lokalisation von den angegebenen überexprimierten Proteinen. Während C-TAK1-Y6131 und C-TAK1-Y6131-L128P (GFP oder Flag) eine cytoplasmatische Lokalisation aufweisen, befindet sich Pim-1 (wt oder K67M als GFP- oder Flag-Protein) sowohl im Kern als auch im Cytoplasma. Das Evi5mut-Protein ist ebenfalls cytoplasmatisch lokalisiert. GFP alleine diente als Kontrolle. b: Sowohl Pim-1-wt als auch Pim-1-K67M liegen mit C-TAK1-Y6131 kolokalisiert vor. Dabei ändert sich die Lokalisation von C-TAK1-Y6131 von cytoplasmatisch zu nukleär/cytoplasmatisch. Es ist gezeigt, dass Pim-1 weder mit der nicht-interagierenden Mutante C-TAK1-L128P noch mit Evi5mut kolokalisiert. Für alle Aufnahmen wurde ein Laser-Scan-Mikroskop verwendet.

2.5. Identifizierung und Isolierung des humanen C-TAK1-Gens

Das humane C-TAK1 ist auf dem Chromosom 14q32.32 lokalisiert und ist eine Spleiß-Variante der humanen Kinase Kp78 (16 Exons). C-TAK1 beinhaltet ein Exon zusätzlich. Ein anderer Name für Kp78 ist MARK3 (engl.: **M**icrotubule **a**ffinity **r**egulatory **k**inase **3**). Das zusätzliche Exon (16 AS) in Bezug auf Kp78 befindet sich an der AS-Position 369. Die Sequenz von C-TAK1 ist in der Datenbank NCBI unter der Accession-Nummer U64205 hinterlegt. C-TAK1 beinhaltet 17 Exons, die 2190 bp enthalten, welche für ein Protein von 729 AS und einem Molekulargewicht von 81 kD kodieren. Die humane vollständige C-TAK1-Sequenz wurde mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide aus einer humanen Leber-cDNA-Bibliothek (Fa.Stratagene) isoliert (Oligonukleotide: C-TAK1-14, C-TAK1-12-1, inseriert in Vektor pBSK). Im Zuge des Verfahrens stellte sich heraus, dass nicht nur die bekannte C-TAK1-cDNA isoliert werden konnte, sondern noch zwei weitere C-TAK1-Isoformen. Die ursprüngliche C-TAK1-Sequenz bzw. das C-TAK1-Protein wird im weiteren Verlauf als C-TAK1-wt bezeichnet. Die zwei Isoformen enthalten ein bzw. zwei Exons zusätzlich (Exon X, 9 AS, Exon Y, 15 AS). Aus der humanen genomischen Sequenz konnte geschlossen werden, dass es sich bei den Isoformen um Spleiß-Varianten handelt (Accession-Nummer: AL139300 und 133367, Contig-Nummer: 026437). Die Insertionsstelle des bzw. der Exons befindet sich zwischen Exon 16 und 17. Die Exon-Intron-Struktur folgt dabei der GT-AG-Regel (Mount, 1982). Während die Spleiß-Variante C-TAK1- α zusätzlich die Exons X und Y enthält (24 AS, gesamt: 753 AS, 83,6 kD), enthält die Spleiß-Variante C-TAK1- β nur Exon Y (zusätzlich 15 AS, gesamt: 744 AS, 82,6 kD). In Abbildung 2.12 sind sowohl das isolierte C-TAK1-Y6131-Fragment der Ratte als auch die isolierten drei humanen C-TAK1-Spleiß-Varianten dargestellt. Die ursprünglich aus dem RRS-System identifizierte Ratten-Sequenz beinhaltet das ATG und den größten Teil der Kinase-Domäne. Die drei Spleiß-Varianten C-TAK1-wt, α und β beinhalten eine Kinase-Domäne (AS 55-307), eine UBA-Domäne (**U**biquitin-assozierte Domäne; AS 328-364) und eine KA1-Domäne (**K**inase-assozierte Domäne **1**; AS 680-729 im C-TAK1-wt-Protein). An AS-Position 614 befindet sich die Insertionsstelle der zusätzlichen Exons XY (C-TAK1- α) oder des zusätzlichen Exons Y (C-TAK1- β).

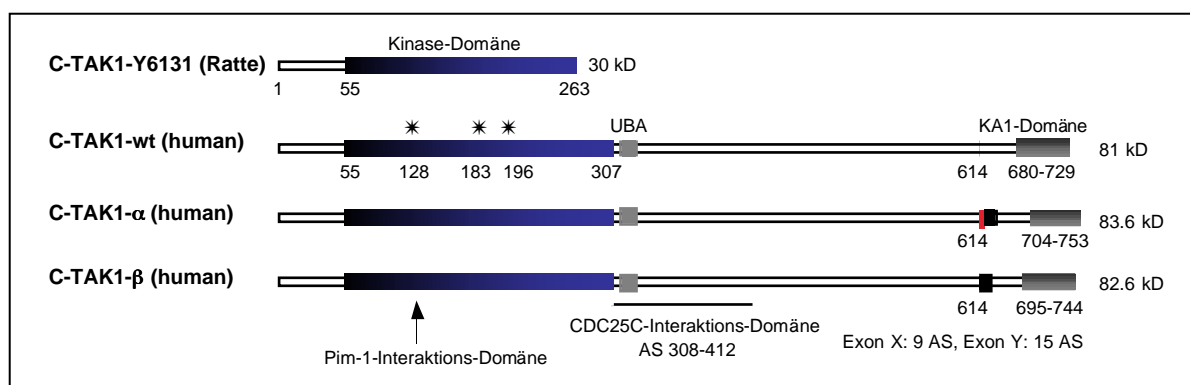


Abb.2.12 Schematische Darstellung des humanen C-TAK1-Proteins

Gezeigt ist die durch das Hefe-Interaktions-Experiment isolierte C-TAK1-Y6131-Ratten-Sequenz sowie die drei verschiedenen C-TAK1-Spleiß-Varianten. Das isolierte Ratten-Fragment beinhaltet den 5'-Teil des Vollängen-Proteins. Es überspannt die ersten 263 AS. Diese beinhalten das ATG und den größten Teil der C-TAK1-Kinase-Domäne. Weiter sind von oben nach unten die drei C-TAK1-Spleiß-Varianten wt, α , β dargestellt. Alle beinhalten eine Kinase-Domäne (AS 55-307) eine UBA-Domäne (Ubiquitin-assoziierte Domäne; AS 328-364) und eine KA1-Domäne (Kinase-assoziierte Domäne 1; AS 680-729 im C-TAK1-wt-Protein). Die AS-Position 614 markiert die AS-Position, an der die zusätzlichen Exons XY (C-TAK1- α) oder das zusätzliche Exon Y (C-TAK1- β) inseriert sind. Weiter sind die Regionen gekennzeichnet, die für die Interaktion mit der Phosphatase CDC25C (Peng *et al.*, 1998) und Pim-1 wichtig sind. Sowohl die AS-Position der nicht-interagierenden PM L128P aus dem Hefe-System als auch die schon veröffentlichten AS-Positionen der kinase-defizienten PM N183A und D196N sind gekennzeichnet (Peng *et al.*, 1998).

2.5.1. C-TAK1-Expression

Die drei C-TAK1-Spleiß-Varianten (wt, α , β) wurden in verschiedene Vektoren kloniert (pCDNA3, EGFP-N3 und GST-4T2). Der GST-4T2-Vektor diente auch als Ziel-Vektor für die Pim-1-wt/-K67M und Ratten-C-TAK1-Sequenzen (C-TAK1-Y6131/-L128P). Für einen Immunoblot wurden Lysate von COS7-Zellen, die mit C-TAK1-Y6131-Flag oder C-TAK1-wt (Vektor pCDNA3) Plasmiden transfiziert worden waren, verwendet.

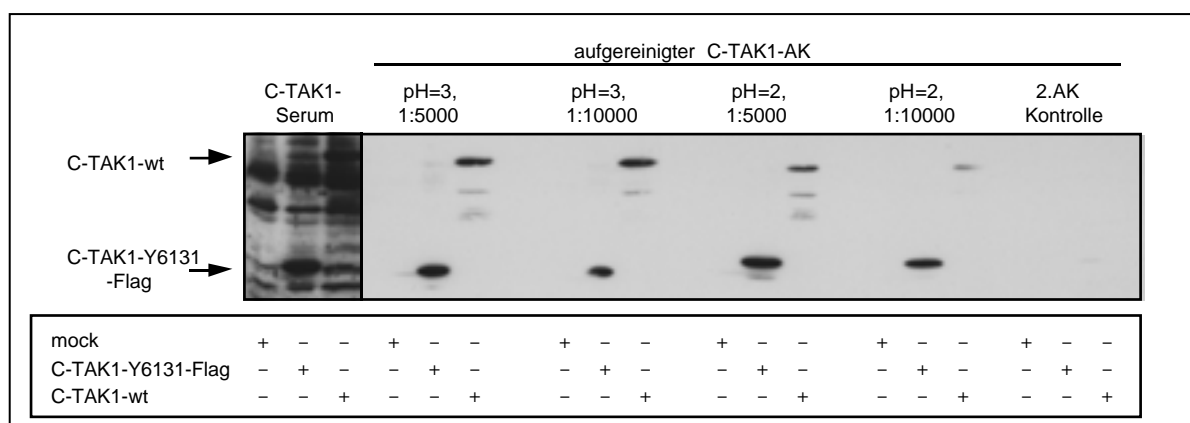


Abb.2.13 Sowohl das C-TAK1-Y6131-Protein der Ratte als auch humanes C-TAK1 werden von dem C-TAK1-AK detektiert

COS7-Zellen wurden mit Plasmiden, die für C-TAK1-Y6131 oder C-TAK1-wt kodieren, transfiziert und die Proteine nach 24 h isoliert. Die Lysate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Zum Nachweis der C-TAK1-Proteine wurde der C-TAK1-AK in verschiedenen Verdünnungen bzw. das C-TAK1-Serum eingesetzt. Der C-TAK1-AK erkennt noch bei einer Verdünnung von 1:10000 sowohl das C-TAK1-Y6131-Protein (Ratte) als auch das humane C-TAK1-wt-Protein.

Abbildung 2.13 zeigt, dass mit dem C-TAK1-AK sowohl das C-TAK1-Y6131-Protein der Ratte als auch das humane C-TAK1-wt-Protein im Immunoblot noch bei einer Verdünnung von 1:10000 detektiert werden kann.

Alle drei C-TAK1-Spleiß-Varianten konnten in eukaryotischen Zellen (COS7) exprimiert werden (Abb.2.14b). Mittels T7-Polymerase konnte aus den C-TAK1-pCDNA3-Vektoren auch ³⁵S-markiertes Protein hergestellt werden (IVT, Abb.2.14a). In beiden Fällen (IVT, COS7-Expression) konnten die geringen Größenunterschiede dargestellt werden. Der verwendete C-TAK1-AK war in der Lage, die exprimierten Spleiß-Varianten von C-TAK1 (mit oder ohne GFP-Anteil) oder das C-TAK1-Y6131-Protein (GFP-markiert) zu detektieren. Der GFP-Anteil beträgt 26 kD. Der GFP-AK wurde als Kontrolle verwendet (Abb.2.14c).

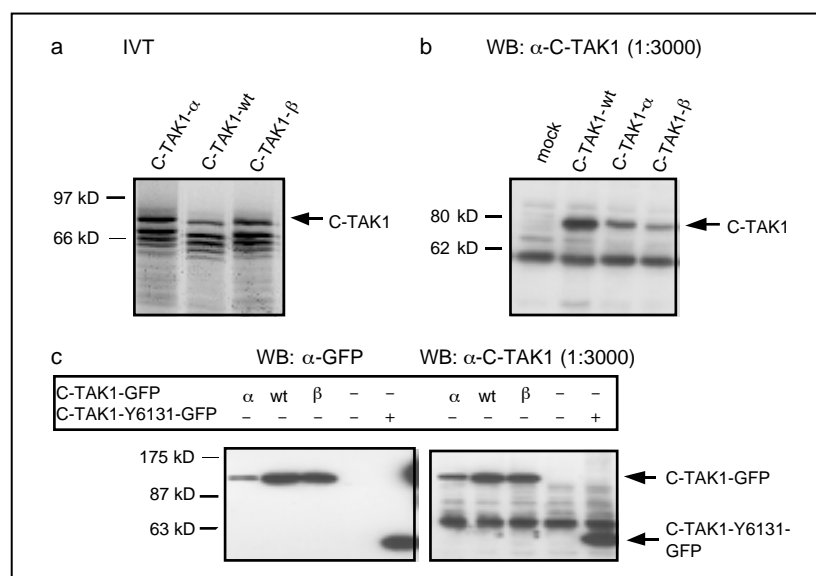


Abb.2.14 Expression der Spleiß-Varianten von C-TAK1

a: Gezeigt sind die ³⁵S-markierten C-TAK1-Spleiß-Varianten (IVT). Der Größenunterschied zwischen den Spleiß-Varianten ist deutlich zu erkennen. b/c: COS7-Zellen wurden mit angegebenen Plasmiden transfiziert und im Immunoblot analysiert. Verwendet wurden der GFP-AK (c) und der polyklonale C-TAK1-AK (b/c). Mit dem C-TAK1-AK konnten alle Spleiß-Varianten von C-TAK1 und das C-TAK1-Y6131-Protein (GFP-markiert) nachgewiesen

werden. Der GFP-AK diente als Kontrolle. IVT: *In-vitro*-Translatat, WB: Immunoblot.

2.6. Biochemische Interaktionsstudien

2.6.1. Interaktion von Pim-1 und C-TAK1

Für weitere Interaktionsstudien wurden alle drei Spleiß-Varianten C-TAK1-wt, α und β und die drei humanen Punktmutanten (PM) C-TAK1-L128P, N183A, D196N, die schon in Abbildung 2.12 dargestellt wurden, verwendet. Alle drei PM wurden über PCR generiert. Bei der L128P-PM handelte es sich um die nicht-interagierende Mutante und bei den N183A und D196N-PM um die schon veröffentlichten, inaktiven PM (Peng *et al.*, 1998). In Bakterien exprimierte GST-Proteine wurden aufgereinigt und mit ^{35}S -markierten C-TAK1-Y6131/-L128P IVT inkubiert. In Abbildung 2.15a wird gezeigt, dass C-TAK1-Y6131 in jedem Präzipitat des GST-Interaktions-Experimentes nachzuweisen war, mit Ausnahme von GST-Jun1-233 und GST, die als Negativ-Kontrollen verwendet wurden. Verschiedene C-TAK1-Proteine bzw. Mutanten wiesen untereinander eine starke Interaktion auf. Das IVT C-TAK1-Y6131 interagiert sowohl mit GST-CDC25C als auch mit beiden Pim-1-Proteinen. Das CDC25C-GST-Protein wurde in Bezug auf C-TAK1 als Positiv-Kontrolle verwendet. Die C-TAK1-L128P-Mutante interagiert zwar noch mit allen C-TAK1-Proteinen, unabhängig davon, ob es sich um das gesamte Protein, um das isolierte Ratten-Protein oder um eine Deletions-Mutante (C-TAK1-165, beinhaltet die AS 1-165 des humanen C-TAK1-Proteins) handelte, aber weder mit beiden Pim-1-Proteinen noch mit CDC25C. Folglich schwächt die Mutation nicht nur die Pim-1/C-TAK1-Interaktion sondern auch die schon veröffentlichte CDC25C/C-TAK1-Interaktion (Peng *et al.*, 1998.).

Bei Verwendung der gleichen aufgereinigten GST-Proteine, konnte ^{35}S -markiertes IVT von Pim-1 in den GST-Komplexen von allen C-TAK1-Proteinen, CDC25C und Pim-1 detektiert werden (Abb.2.15b). Dabei war die Interaktion zwischen C-TAK1-Spleiß-Varianten untereinander, dem isolierten Ratten-Protein und der C-TAK1-165-Deletion am stärksten. Offensichtlich reichen also die N-terminalen 165 AS des C-TAK1-Proteins für eine Interaktion mit Pim-1 aus. ^{35}S -markiertes Pim-1 konnte ebenfalls, wenn auch schwach, sowohl in den Präzipitaten von Pim-1-wt/ K76M als auch von CDC25C detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Pim-1 mit einem weiteren Pim-1-Protein (Abb. 2.9), mit C-TAK1 (Abb.2.9, 2.10, 2.11) und zusätzlich mit CDC25C interagieren kann. ^{35}S -markiertes C-TAK1-wt IVT interagiert mit allen C-TAK1-, Pim-1- und CDC25C-Proteinen. Gleiches galt für C-TAK1- α und C-TAK1- β (Daten nicht gezeigt). GST-Jun und GST wurden jeweils als Negativ-Kontrollen verwendet.

^{35}S -markiertes C-TAK1-Protein wurde sowohl in den koimmunopräzipitierten Komplexen von dem isolierten C-TAK1-Y6131-Flag Ratten Protein als auch von beiden Pim-1-Proteinen

detektiert (Abb.2.15c, gleiches galt für C-TAK1- α/β , Daten nicht gezeigt). Evi5mut und Pias3 dienten als Negativ-Kontrollen. Abbildung 2.15.d zeigt, dass sowohl alle C-TAK1-Spleiß-Varianten als auch die N183A und D196N-Mutanten mit Pim-1-wt (Lysat aus Pim-1-wt transfizierten COS7-Zellen) interagierten. Die Mutante C-TAK1-L128P hatte allerdings die Fähigkeit verloren, mit Pim-1 zu interagieren. Gleiches galt für Pim-1-K67M (Daten nicht gezeigt). Somit hat die L128P-Mutation im C-TAK1-Volllängen-Protein den gleichen Effekt wie im C-TAK1-Y6131-L128P-Protein (Abb.2.10b und 2.11). Auch eine Mutante, in der die ersten 80 AS vom 5'-Ende deletiert wurden (C-TAK1-Ndel), interagierte noch mit Pim-1. Dadurch konnte die Interaktions-Domäne auf Seiten des C-TAK1-Proteins auf den Bereich der AS 81-165 eingengt werden. GST-Jun1-233 diente als Negativ-Kontrolle.

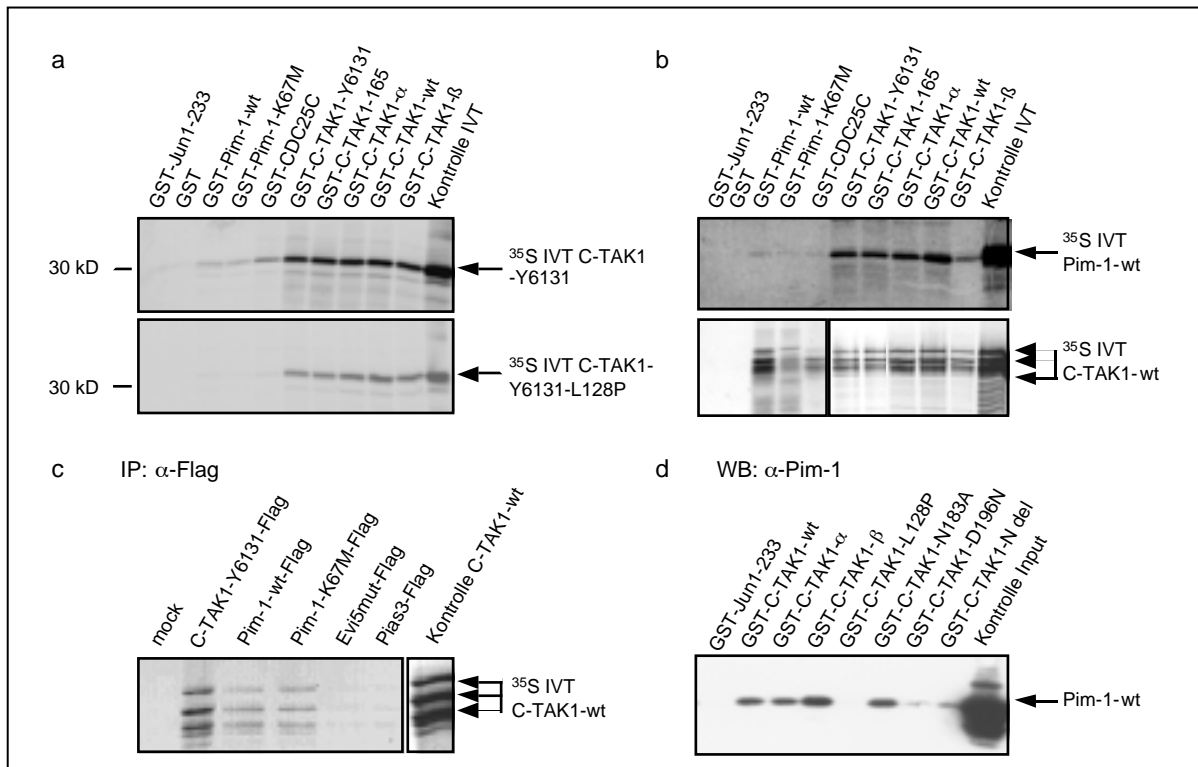


Abb. 2.15 Detektion von Pim-1 und C-TAK1 in Immunopräzipitationen und GST-Interaktions-Experimenten

Verschiedene Konstrukte von Pim-1, C-TAK1 und CDC25C wurden in Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt (a, b, d). a/b: Die an Glutathion-Agarose-Harz gekoppelten aufgereinigten Proteine wurden mit ^{35}S -markierten C-TAK1-Y6131, C-TAK1-Y6131-L128P, C-TAK1 oder Pim-1-wt-Proteinen inkubiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie auf deren Interaktion analysiert. c: COS7-Zellen wurden mit angegebenen Plasmiden transfiziert und die Proteine nach 24 h isoliert. Lysate wurden mit ^{35}S -markierten C-TAK1-wt-Protein inkubiert, mit dem Flag-AK immunopräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. d: Die an Glutathion-Agarose-Harz gekoppelten aufgereinigten Proteine wurden mit Lysat aus Pim-1-wt transfizierten COS7-Zellen inkubiert und mittels Immunoblot analysiert. ^{35}S -markierte C-TAK1-Y6131 (a) und C-TAK1-wt-Proteine (b, c) interagierten mit allen C-TAK1-Proteinen, Pim-1 und CDC25C. Dieses konnte sowohl im GST-Interaktions-Experimenten (a/b) als auch in den Immunopräzipitationen (c) gezeigt werden. Die C-TAK1-L128P-PM ist nur in der Lage mit anderen C-TAK1-Proteinen zu interagieren (a). Pim-1 interagiert mit sich selbst (b), mit allen C-TAK1-Spleiß-Varianten (b) und Punktmutanten (PM) von C-TAK1 (d) und CDC25C (b), aber nicht mit der Mutante C-TAK1-Y6131-L128P (a) und C-TAK1-L128P (d). IP: Immunopräzipitation, WB: Immunoblot.

2.6.2. Interaktion von Pim-1 und CDC25C

Es war bekannt, dass die Kinase C-TAK1 die Phosphatase CDC25C durch Phosphorylierung an der AS Ser216 inaktiviert (Peng *et al.*, 1998). Um die Frage zu beantworten, ob Pim-1 ebenfalls mit CDC25C interagiert, wurden GST-Interaktions-Experimente durchgeführt. Dafür wurden zusätzliche GST-Deletions-Mutanten hergestellt, die zum einen die AS bis 211 oder 235 beinhalteten oder erst ab AS 180 begannen. Abbildung 2.16 zeigt, dass beide Pim-1-Proteine sowohl mit dem CDC25C-wt-Protein als auch mit den CDC25C-Deletions-Mutanten interagierten. Dadurch konnte die Interaktions-Domäne auf einen mittleren Teil des CDC25C-Proteins eingengt werden, der von den AS 180-211 begrenzt wird.

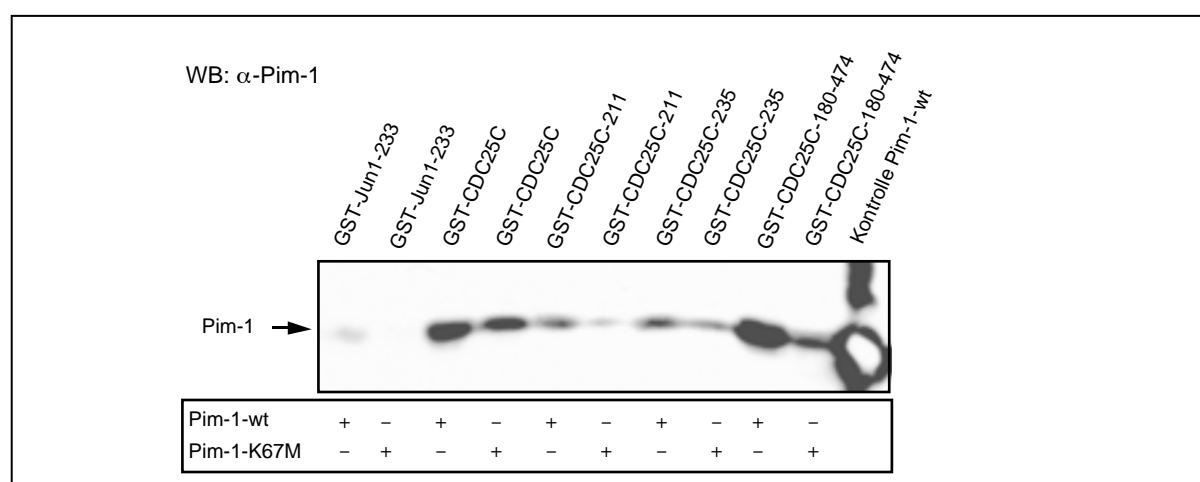


Abb.2.16 Interaktion von Pim-1 und CDC25C

Die an Glutathion-Agarose-Harz gekoppelten aufgereinigten CDC25C-Proteine wurden mit Zellysat aus Pim-1-wt oder Pim-1-K67M transfizierten COS7-Zellen inkubiert und mittels Immunoblot analysiert. Pim-1 interagiert sowohl mit CDC25C als auch mit den Deletions-CDC25C-Mutanten. GST-Jun1-233 diente als Negativ-Kontrolle. WB: Immunoblot.

2.6.3. Kolokalisation von Pim-1/C-TAK1 und Pim-1/CDC25C

Im nächsten Schritt wurden von allen sechs verschiedenen C-TAK-1-Proteinen (Spleiß-Varianten und PM), sowie von einer CDC25C-Mutante, die einen AS-Austausch an der Position 216 von Serin zu Alanin aufweist (S216A), die zelluläre Lokalisation untersucht. Die CDC25C-S216A-Mutante kann nicht mehr von C-TAK1 phosphoryliert werden (Peng *et al.*, 1998). Für Immunfluoreszenzstudien wurden NIH 3T3-Zellen verwendet (siehe Kolokalisation von Pim-1-wt und C-TAK1-Y6131 (Abb.2.11). Alle C-TAK1-Spleiß-Varianten und PM wiesen eine cytoplasmatische Lokalisation auf (Abb.2.17). Das Fusionieren an einen Flag- oder GFP-Marker besaß keine Auswirkung auf die Lokalisation der jeweiligen Proteine. Der selbst hergestellte C-TAK1-AK war ebenfalls zum Nachweis der C-TAK1-Proteine in

Immunfluoreszenzexperimenten geeignet. CDC25C und CDC25C-S216A waren cytoplasmatisch lokalisiert. Die Lokalisation von Pim-1 war schon in Abbildung 2.11 dargestellt (nukleäre und cytoplasmatische Lokalisation).

Sobald Pim-1 kotransfiziert wurde, zeigte sich, dass alle drei C-TAK1-Spleiß-Varianten (wt, α , β) und auch die beiden veröffentlichten PM N183A und D196N mit Pim-1 kolokalisierten, nicht aber die Mutante L128P (Abb.2.18a). Alle C-TAK-1-Proteine waren sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert und wiesen eine mit Pim-1 identische Lokalisation auf. In der Lokalisationsstudie von Pim-1 und C-TAK1-wt war der Unterschied zwischen einer nur mit C-TAK1-GFP und einer mit C-TAK1-GFP und Pim-1-wt kotransfizierten Zelle zu sehen. Wenn Pim-1 nicht überexprimiert vorlag, war C-TAK1 nur cytoplasmatisch lokalisiert. Sobald Pim-1 koexprimiert wurde, änderte sich die Lokalisation von C-TAK1 und C-TAK1 konnte ebenfalls im Zellkern detektiert werden.

In Kolokalisationsstudien zwischen CDC25C und Pim-1-wt war zu sehen, dass auch CDC25C sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist (Abb.2.18b), obwohl CDC25C in Abwesenheit von Pim-1, vergleichbar mit C-TAK1, eine cytoplasmatische Lokalisation aufwies (Abb.2.17). Allerdings war diese Verteilung der Proteine nicht vollständig in allen transfizierten Zellen nachweisbar. In einigen Fällen war CDC25C auch cytoplasmatisch lokalisiert. Bei Kotransfektion der Pim-1-K67M-Mutante konnte CDC25C nur im Cytoplasma detektiert werden. Die CDC25C-S216A-Mutante war, unabhängig von einer Pim-1 Kotransfektion, cytoplasmatisch lokalisiert. Durch die Immunfluoreszenzstudien konnte nicht eindeutig bewiesen werden, dass Pim-1 mit CDC25C interagiert. Da bekannt war, dass C-TAK1 und CDC25C interagieren, wurde eine Kolokalisation dieser beiden Proteine als Positiv-Kontrolle verwendet (Abb.2.18b). Bei Kotransfektion der nicht mit Pim-1 interagierenden Mutante C-TAK1-L128P und CDC25C waren beide Proteine cytoplasmatisch lokalisiert, aber eine klare Kolokalisation war nicht zu erkennen. In Abbildung 2.15a wurde schon in einem GST-Interaktions-Experiment gezeigt, dass C-TAK1-Y6131-L128P die Fähigkeit verloren hat, mit CDC25C zu interagieren. C-TAK1 war allerdings in der Lage mit der Mutante CDC25C-S216A zu kolokalisieren. Diese Mutation zeigte keinen Effekt auf die Interaktion oder auf die Lokalisation mit den beiden Proteinen Pim-1 und C-TAK1 auf.

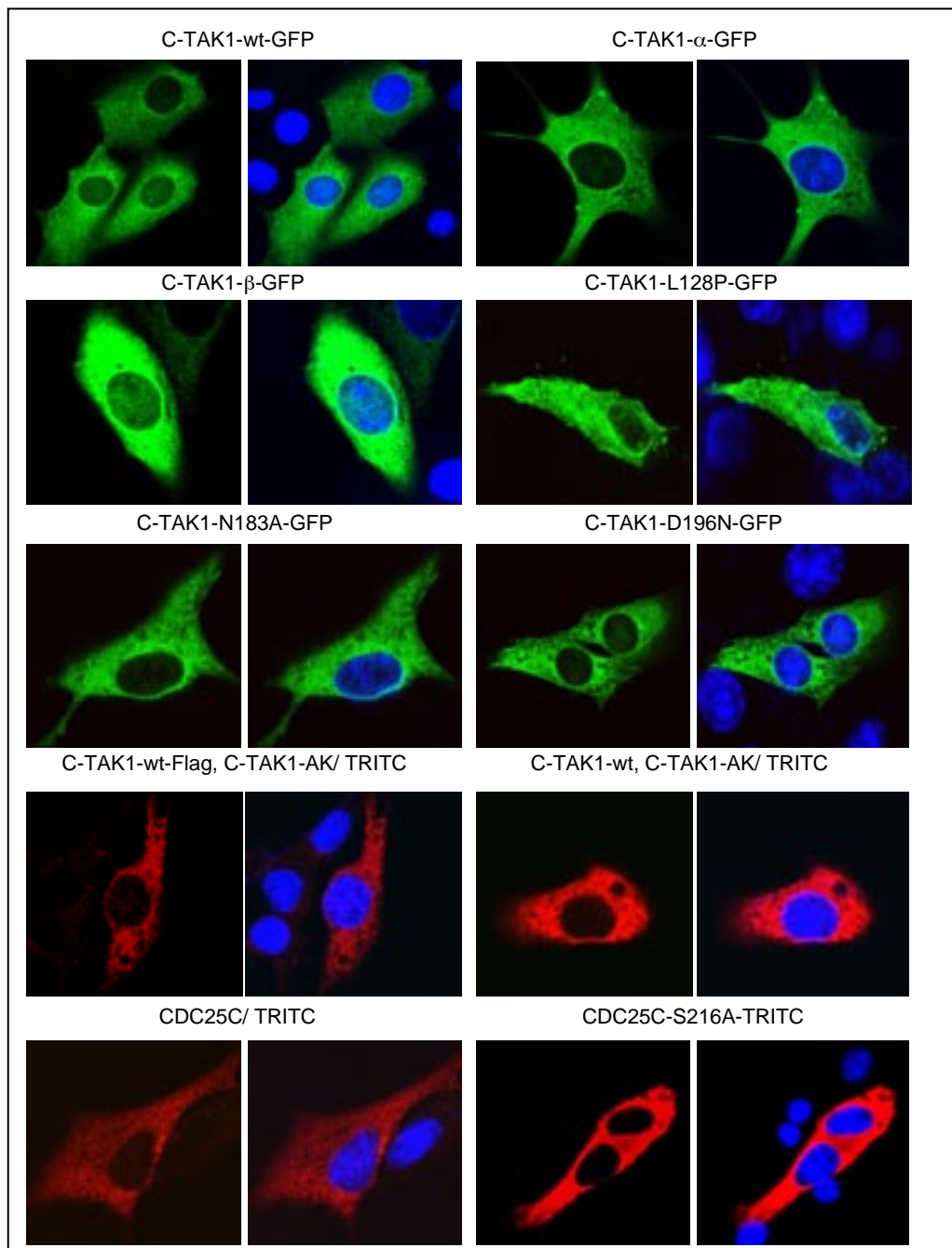


Abb.2.17 Zelluläre Lokalisation von C-TAK1 und CDC25C in NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und 24 h später mit Methanol fixiert. Die C-TAK-1-Spleiß-Varianten und die C-TAK1-PM waren GFP-markiert. Alternativ wurden der C-TAK1-AK, ein CDC25C-AK und die entsprechenden TRITC markierten 2. AK verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Alle Proteine sind im Cytoplasma lokalisiert. Für alle Aufnahmen wurde ein Laser-Scan-Mikroskop verwendet.

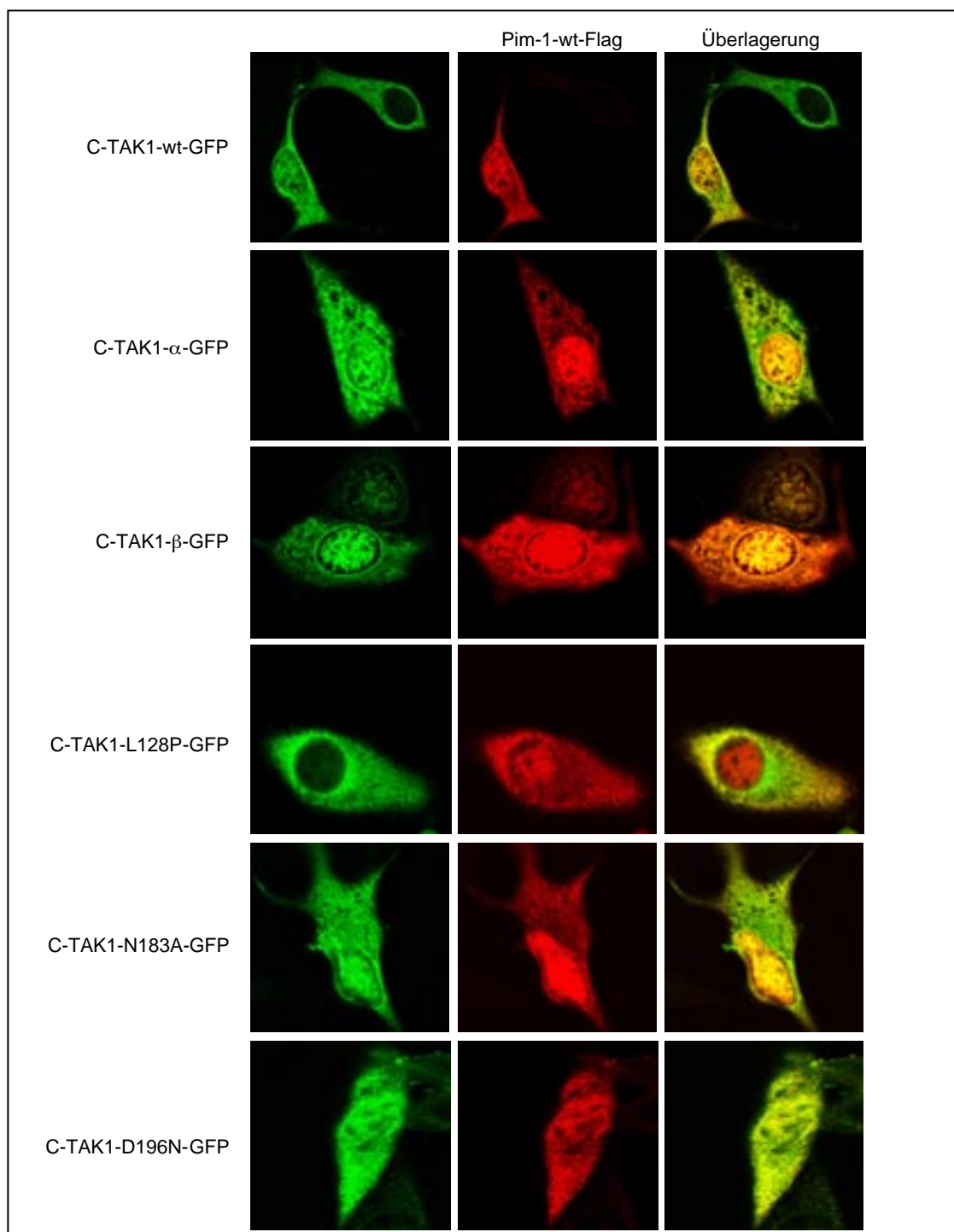


Abb.2.18a Zelluläre Kolokalisation von Pim-1/C-TAK1 in NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten kotransfiziert und 24 h später mit Methanol fixiert. Die C-TAK1-Spleiß-Varianten und die C-TAK1-PM waren GFP-markiert. Pim-1-Flag wurde mit dem Flag-AK und einem TRITC-markierten 2. AK detektiert. Pim-1 ist mit allen C-TAK1-Spleiß-Varianten oder Mutanten, aber nicht mit der nicht-interagierenden Mutante L128P kolokalisiert. Für alle Aufnahmen wurde ein Laser-Scan-Mikroskop verwendet.

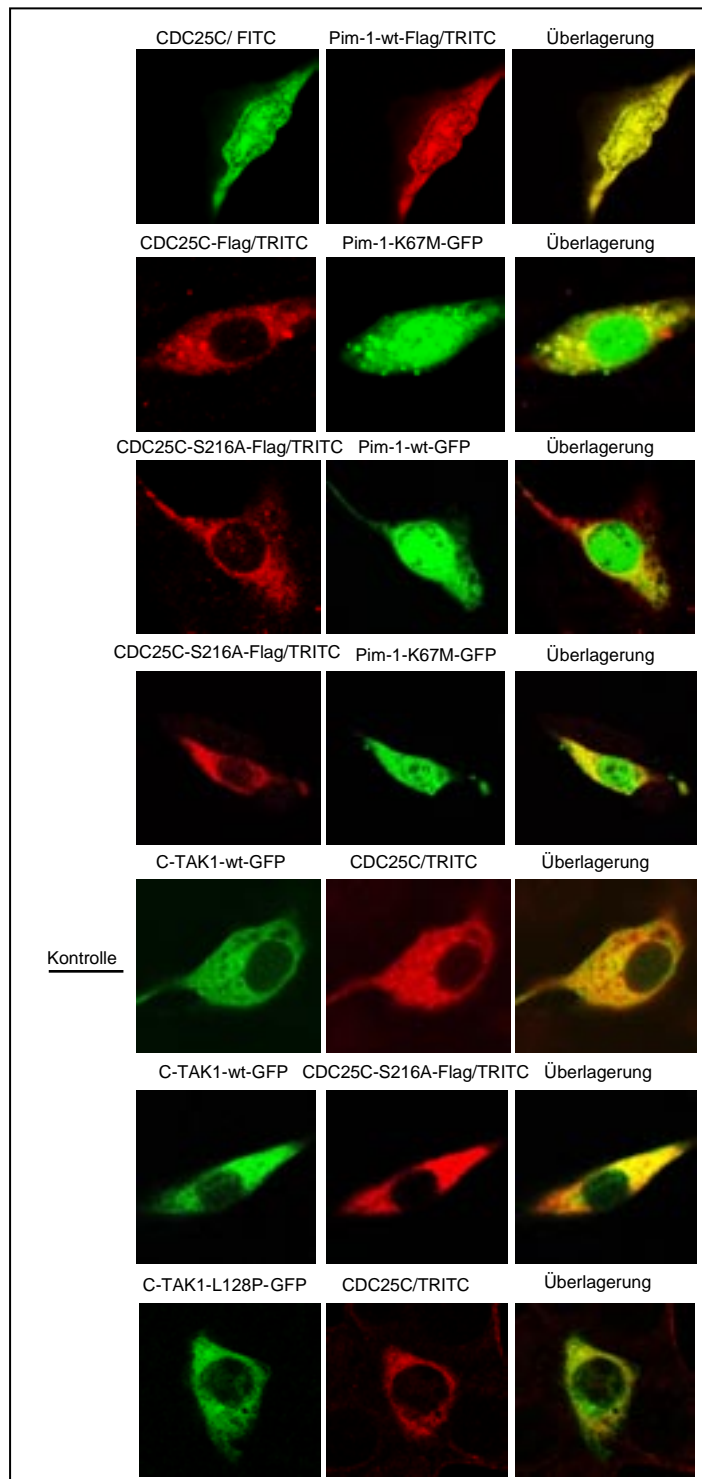


Abb.2.18b Zelluläre Kolokalisation von Pim-1/CDC25C und C-TAK1/CDC25C in NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten kotransfiziert und 24 h später mit Methanol fixiert. Die C-TAK-1-Proteine waren GFP-markiert. Pim-1-Flag wurde mit dem α -Flag-AK, CDC25C mit dem α -CDC25C-AK detektiert. Als 2. AK wurde der jeweilige FITC/TRITC-konjugierte AK verwendet. Während Pim-1-wt noch mit CDC25C in der Zelle kolokalisiert vorliegt (es ist nicht in allen transfizierten Zellen der Fall gewesen), ist dies bei Pim-1-K67M nicht mehr detektierbar. Die Mutante CDC25C-S216A weist mit Pim-1 ebenfalls keine Kolokalisation auf. C-TAK1 liegt mit CDC25C (Positiv-Kontrolle) und mit der Mutante CDC25C-S216A kolokalisiert vor, weist aber ebenfalls mit der Mutante C-TAK1-L128P keine Kolokalisation auf. Für alle Aufnahmen wurde ein Laser-Scan-Mikroskop verwendet.

All diese Ergebnisse wiesen auf eine Interaktion zwischen Pim-1 und C-TAK1 hin. Die beiden Proteine Pim-1 und CDC25C waren nur im Fall von Pim-1-wt und CDC25C teilweise kolokalisiert. Die inaktive Mutante Pim-1-K67M wurde nicht in einem zellulären Komplex mit CDC25C vorgefunden. Während die CDC25C-S216A-Mutante mit keinem der Pim-1-Proteine kolokalisiert war, konnte diese noch mit C-TAK1 interagieren. Andererseits war aber die C-TAK1-L128P-Mutante nicht in der Lage, mit CDC25C zu interagieren (vgl. Abb.2.15).

2.7. Kinasierungsexperimente

Es ist bekannt, dass sowohl Pim-1 als auch C-TAK1 die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzen. Weiterhin konnte für C-TAK1-wt gezeigt werden, dass es in der Lage ist, die Phosphatase CDC25C am Ser216 zu phosphorylieren (Peng *et al.*, 1998). Für diese Kinase-Experimente wurden in Bakterien exprimierte und aufgereinigte GST-Fusions-Proteine und immunpräzipitierte Flag-Proteine aus transfizierten COS7-Zellen verwendet.

2.7.1. CDC25C-Phosphorylierung durch C-TAK1 (Peng *et al.*, 1998)

Zunächst konnte bestätigt werden, dass sowohl Pim-1-wt als auch C-TAK1-wt eine Autophosphorylierung aufweisen (Palaty *et al.*, 1997b; Peng *et al.*, 1998; Abb.2.19). Die Mutante Pim-1-K67M ist inaktiv und nicht in der Lage, sich selbst zu phosphorylieren. GST allein wurde von allen verwendeten Kinasen nicht phosphoryliert (Abb.2.19). Während autophosphoryliertes GST-Pim-1 ein Molekulargewicht von 60 kD besitzt, konnten mit C-TAK1-wt zwei phosphorylierte Proteine detektiert werden (Abb.2.19). Zum einen handelte es sich um das GST-C-TAK1-wt-Protein mit einem Molekulargewicht von 107 kD. Das zweite Signal, dessen Protein einem Molekulargewicht von ca. 78 kD entsprach, repräsentiert wahrscheinlich ein Abbauprodukt. Beide Proteine wurden im Immunoblot sowohl von einem GST-, als auch von dem C-TAK1-AK erkannt (Abb.2.19c). Um zu untersuchen, ob C-TAK1-wt und die beiden Spleiß-Varianten aktiv sind, wurden diese auf ihre Kinase-Aktivität mit CDC25C als Substrat getestet. Dabei wurde sowohl das GST-CDC25C-Fusionsprotein als auch rekombinantes His-markiertes CDC25C (Fa. Biodiagnostics) verwendet. CDC25C besitzt ein Molekulargewicht von 53 kD. Sowohl C-TAK1-wt als auch die beiden neuen Spleiß-Varianten wiesen ein typisches Signal der Autophosphorylierung auf. Rekombinantes CDC25C-Protein wurde von allen C-TAK1-Spleiß-Varianten phosphoryliert (Abb.2.19). Das GST-CDC25C-Protein wurde ebenfalls von C-TAK1-wt phosphoryliert und wies zwei Signale auf. Dabei handelte es sich zum einen um das gesamte GST-CDC25C-Protein (80 kD) und zum anderen um einen GST-CDC25C-Protein-Anteil, welcher ein etwas geringeres Molekulargewicht als das rekombinante CDC25C-Protein besitzt. Beide Signale werden

sowohl mit einem GST als auch mit einem CDC25C-AK erhalten (Abb.2.19c). GST-Pim-1 wies im Kinase-Experiment nur ein Signal bei 60 kD auf, das sowohl mit einem Pim-1-AK als auch mit einem GST-AK erhalten wurde.

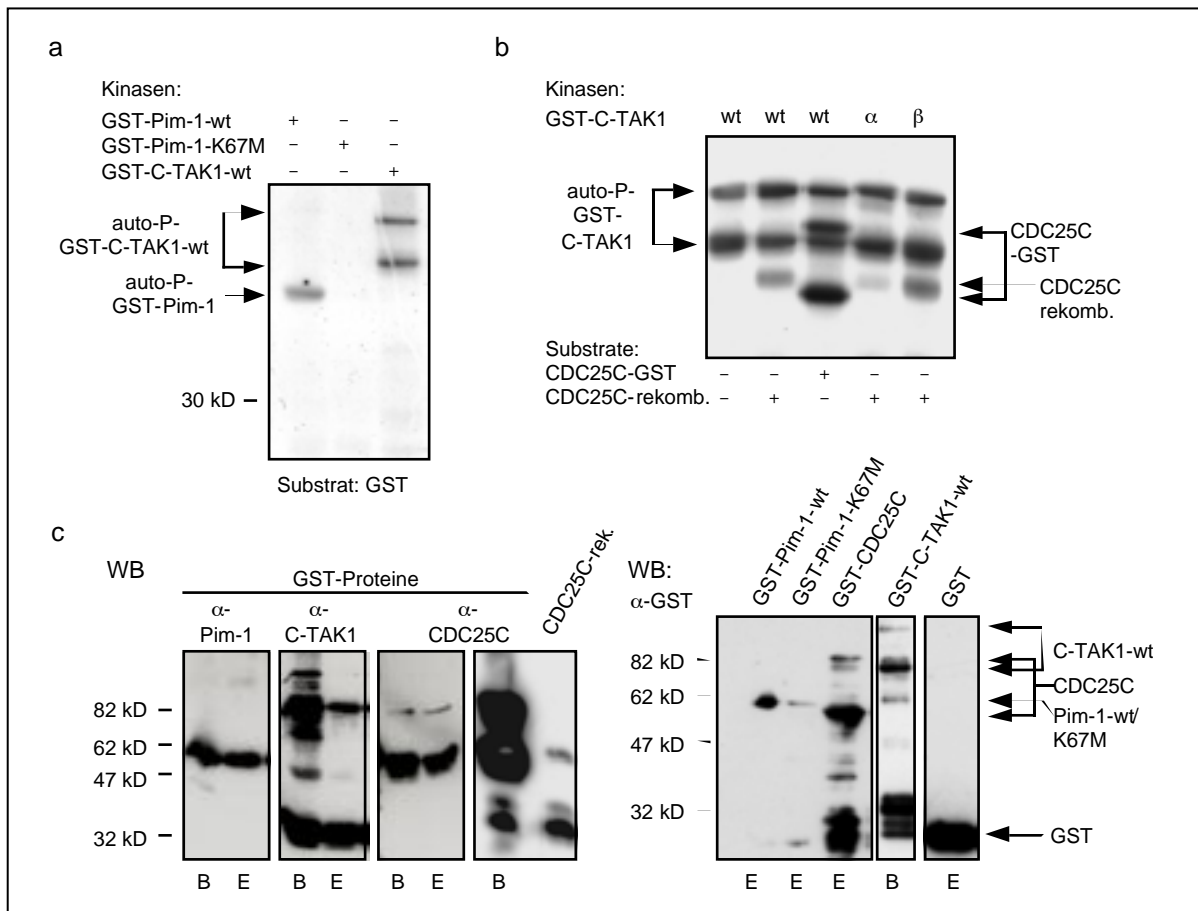


Abb.2.19 CDC25C-Phosphorylierung durch C-TAK1

GST-C-TAK1-wt, die beiden Spleiß-Varianten α und β , GST-CDC25C, Pim-1-Proteine und GST wurden in Bakterien exprimiert und für Kinase-Experimente verwendet. a: Sowohl Pim-1-wt als auch C-TAK1-wt zeigen Autophosphorylierung. Die inaktive Pim-1-K67M-Mutante weist keine Autophosphorylierung auf. GST allein wird weder von Pim-1 noch von C-TAK1 phosphoryliert. b: Sowohl C-TAK1-wt als auch die C-TAK1-Spleiß-Varianten zeigen Autophosphorylierung. Alle C-TAK1-Spleiß-Varianten sind in der Lage, rekombinantes CDC25C zu phosphorylieren. Gezeigt ist ebenfalls die Phosphorylierung von GST-CDC25C durch C-TAK1-wt (Peng *et al.*, 1998). c: In Bakterien exprimierte und aufgereinigte GST-Proteine wurden im Immunoblot untersucht. Die Proteine wurden mittels GST, Pim-1, C-TAK1, und CDC25C-AK und mit den entsprechenden 2. AK im Immunoblot analysiert. Die Signale der GST-Proteine wurden von den jeweiligen AK und von dem GST-AK detektiert. Im Falle von sowohl C-TAK1 als auch CDC25C wurden zwei dominante Signale erhalten, die sowohl mit dem entsprechenden AK als auch mit dem GST-AK zu detektieren waren. B: Proteine an Harz gekoppelt, E: eluierte Proteine, WB: Immunoblot.

2.7.2. C-TAK1-PM besitzen keine Kinase-Aktivität

Weiter war es von Interesse zu untersuchen, ob alle C-TAK1-PM die Phosphatase CDC25C phosphorylieren können. Bisher war bekannt, dass die beiden PM C-TAK1-N183A und D196N kinase-inaktiv sind (Peng *et al.*, 1998). Sowohl das C-TAK1-Protein der Ratte als auch das humane C-TAK1-Protein, das die L128P-Mutation tragen, konnten weder mit Pim-1 noch mit CDC25C interagieren (Abb.2.15). Pim-1 und CDC25C wiesen auch in der Immunfluoreszenz mit C-TAK1-L128P keine Kolo-kalisation auf (Abb.2.18a/b). Die *in-vitro* Kinase-Experimente zeigten, dass nur C-TAK1-wt in der Lage war, rekombinantes oder GST-CDC25C-Protein zu phosphorylieren. Keine der PM wies eine Autophosphorylierung auf (Abb.2.20). Sowohl C-TAK1 als auch GST-CDC25C wurden mit zwei Signalen detektiert (Abb.2.20).

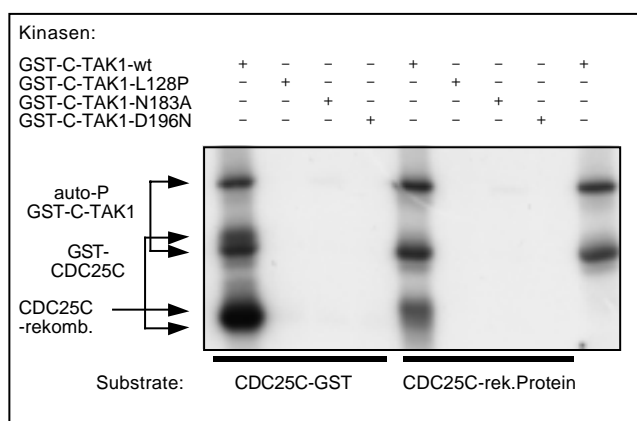


Abb.2.20 CDC25C wird durch C-TAK1-wt, aber nicht durch die C-TAK1-PM phosphoryliert

GST-C-TAK1-wt, die drei PM L128P, N183A, D196N und GST-CDC25C wurden in Bakterien exprimiert und in Kinase-Experimenten eingesetzt. Als weiteres Substrat wurde rekombinantes His-markiertes CDC25C-Protein verwendet. C-TAK1-wt ist in der Lage sich selbst und CDC25C zu phosphorylieren. Alle PM haben die Fähigkeit zur Auto- und zur CDC25C-Phosphorylierung verloren.

2.7.3. C-TAK1-Phosphorylierung durch Pim-1

Da es sich bei beiden Proteinen Pim-1 und C-TAK1 um Kinasen handelt, war es im weiteren Verlauf der Arbeit von großer Bedeutung herauszufinden, ob Pim-1 C-TAK1 phosphoryliert oder ob Pim-1 durch C-TAK1 phosphoryliert wird. Die NLS-Sequenzen des C-TAK1-Proteins im C-terminalen Bereich (AS 484-PERKKSST-491 und 569-PRERRTA-574) stellen ein Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv (unterstrichen) und ein abgewandeltes Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv dar. Aufgrund der Autophosphorylierung von beiden Proteinen konnte nicht gezeigt werden, ob Pim-1-wt von C-TAK1-wt/ α/β phosphoryliert wird oder umgekehrt. Für die inaktive Pim-1-K67M-Kinase konnte allerdings gezeigt werden, dass sie weder durch Autophosphorylierung noch durch C-TAK1 phosphoryliert wird (Abb.2.21a), obwohl Pim-1-K67M mit C-TAK1 interagiert (Abb.2.15a, b, c). Dies deutete bereits darauf hin, dass Pim-1 nicht von C-TAK1 phosphoryliert werden kann. Dies wurde in einem Experiment deutlicher, in dem Pim-1 als Kinase verwendet wurde (unter Pim-1-Kinase-Bedingungen). Die Phosphorylierung von C-TAK1-wt und von beiden Spleiß-Varianten ist stärker, wenn Pim-1-wt als Kinase eingesetzt wurde (Abb.2.21b).

Dabei war aber immer noch die C-TAK1-Autophosphorylierung detektierbar. Wurde Pim-1-K67M als Kinase verwendet, ist nur die Autophosphorylierung von C-TAK1 sichtbar, da Pim-1-K67M weder sich selbst noch C-TAK1 phosphorylieren kann. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass Pim-1-wt, aber nicht Pim-1-K67M, zusätzlich die Phosphatase CDC25C phosphoryliert (Abb.2.21b, siehe auch 2.7.4).

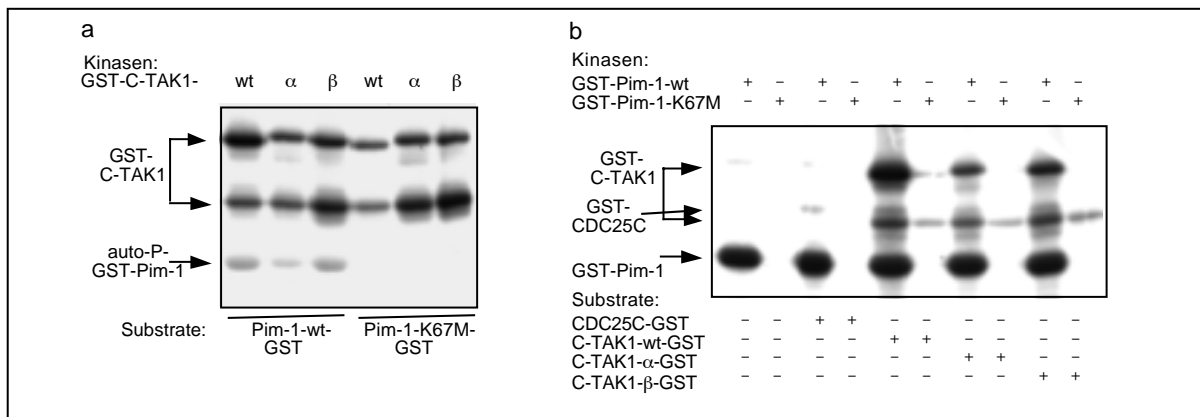


Abb.2.21 Pim-1-wt phosphoryliert alle C-TAK1-Spleiß-Varianten

Alle GST-Proteine wurden in Bakterien exprimiert und für Kinase-Experimente verwendet. a: Sowohl Pim-1-wt, C-TAK1-wt als auch die beiden neuen Spleiß-Varianten zeigen eine Autophosphorylierung. Die inaktive Pim-1-K67M-Mutante weist keine Autophosphorylierung auf. Pim-1-K67M wird nicht von C-TAK1 phosphoryliert. b: Pim-1-wt, aber nicht Pim-1-K67M, phosphoryliert C-TAK1-wt, die zwei Spleiß-Varianten und CDC25C. Weiter konnte die Autophosphorylierungen von Pim-1-wt und allen C-TAK1-Proteinen detektiert werden.

Abbildung 2.22 zeigt, dass Pim-1-wt-GST, nicht aber Pim-1-K67M-GST, die Kinase C-TAK1-GST phosphorylieren konnte. Während C-TAK1-wt eine Autophosphorylierung aufwies, war das bei den beiden Mutanten N183A und D196N nicht der Fall. Dennoch konnte eine Phosphorylierung beider Mutanten detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Pim-1-wt für dessen Phosphorylierung verantwortlich war und dass C-TAK1 durch Pim-1-wt phosphoryliert wurde. Die nicht-interagierende PM L128P wurde von Pim-1-wt nicht phosphoryliert. Die beiden PM N183 und D196N wiesen größtenteils nur Signal auf, was darauf hindeutet, dass Pim-1-wt einen anderen AS-Rest phosphoryliert als C-TAK1 selbst. Weiterhin ist auch die Pim-1-wt Autophosphorylierung sichtbar. GST-Pim-1-K67M ist nicht in der Lage C-TAK1 oder eine der PM zu phosphorylieren. Als Kinase konnte auch *in-vivo* exprimiertes Flag-Pim-1-Protein verwendet werden, was zum gleichen Resultat führte. Dazu wurde das Flag-Immunopräzipitat aus Flag-Pim-1 transfizierten COS7-Zellen als Kinase verwendet.

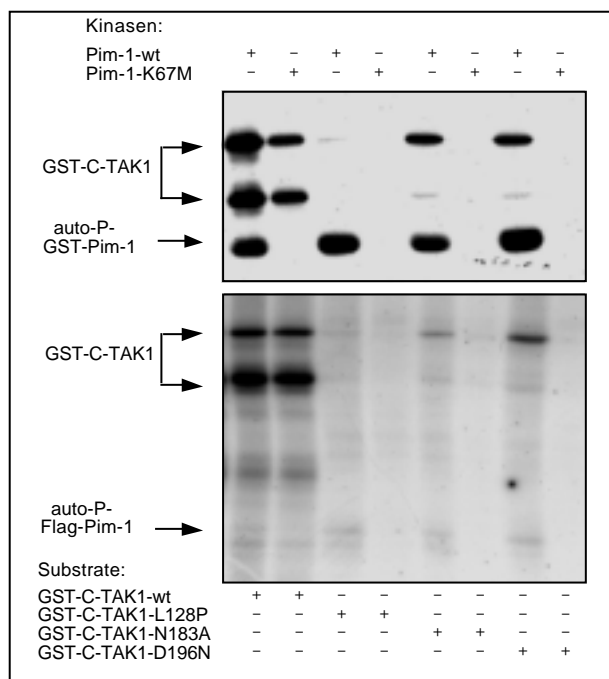


Abb.2.22 Pim-1-wt phosphoryliert C-TAK1, die C-TAK1-PM aber nicht C-TAK1-L128P

Pim-1-wt oder Pim-1-K67M wurden entweder in Bakterien (GST-Pim-1, oben) oder in COS7-Zellen (unten) exprimiert. Das COS7-Zellysat wurde mit einem Flag-AK immunopräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden für die Kinase-Experimente verwendet. Gezeigt ist, dass Pim-1-wt die Kinase C-TAK1-wt und die zwei schon veröffentlichten PM phosphoryliert, aber nicht die Mutante C-TAK1-L128P. Pim-K67M hat die Fähigkeit verloren, C-TAK1 und die PM zu phosphorylieren und ist ebenfalls zur Autophosphorylierung nicht fähig.

Nach Feststellung, dass die Kinase C-TAK1 ein Substrat von Pim-1 darstellt, war weiter von großem Interesse herauszufinden, in welchen Regionen C-TAK1 durch Pim-1 phosphoryliert wird. In Abbildung 2.15b, c, d ist gezeigt, dass Pim-1 mit allen C-TAK1-Vollängen-Proteinen (außer mit C-TAK1-L128P), C-TAK1-Y6131 (AS 1-263), C-TAK1-165 und C-TAK1-N-del (AS 81-729) interagieren konnte. Eine Tabelle der verwendeten C-TAK1-Proteine ist in Abbildung 2.25 gezeigt. Diese Ergebnisse grenzten die Interaktions-Domäne auf Seiten des C-TAK1-Proteins auf die AS 81-165 ein. Es wurden zur Untersuchung der Interaktions-Domäne noch zwei weitere Deletionen hergestellt. Dabei handelte es sich um ein N-terminales Fragment welches die AS 1-111 beinhaltete und ein weiteres Fragment, welches die AS 81-178 enthielt. Während die Mutante C TAK1-81-178 noch mit Pim-1 interagierte, hatte die C-TAK1-1-111-Mutante diese Fähigkeit verloren (Abb.2.23). Dadurch konnte die Pim-1-Interaktions-Domäne auf die AS 112-165 eingengt werden. In diesem Bereich liegt auch die L128P-PM. Weiterhin interagierten die beiden Deletions-Mutanten mit C-TAK-wt bzw. mit dem isolierten Protein aus der Ratte, wodurch die C-TAK1/C-TAK1-Interaktions-Domäne auf die AS 81-111 begrenzt werden konnte.

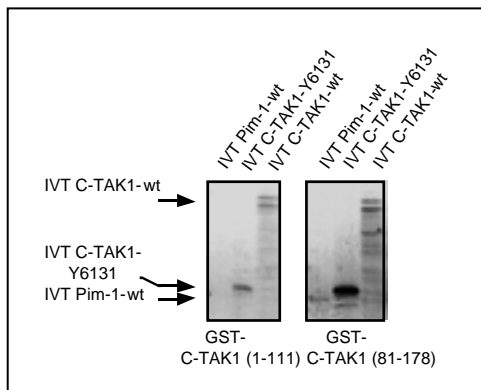


Abb.2.23 Eingrenzung der Pim-1-Interaktions-Domäne auf Seiten des C-TAK1-Proteins

Die beiden Deletions-Mutanten C-TAK1-1-111 und 81-178 (Abb.2.25) wurden als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Die Proteine wurden mit ³⁵S-markierten Proteinen (IVT) von Pim-1-wt, C-TAK1-Y6131 und C-TAK1-wt inkubiert und mittels Immunoblot und Autoradiographie auf deren Interaktion analysiert. Während die Mutante 81-178 sowohl mit Pim-1-wt als auch mit den beiden C-TAK1-Proteinen interagiert, ist die 1-111-Mutante nur noch in der Lage mit den beiden C-TAK1-Proteinen zu interagieren. Somit konnte festgelegt werden, dass die

Pim-1-Interaktions-Domäne von den AS 112 und 165 begrenzt wird. Die C-TAK1/C-TAK1-Interaktions-Domäne überspannt den Bereich der AS 81-111.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass Pim-1-wt eine weitere C-TAK1-Deletions-Mutante (C-TAK1-N-del (98 kD)) phosphorylieren kann (Abb.2.24). Diese N-terminale Deletions-Mutante war nicht zur Autophosphorylierung fähig. Als Substrat-Negativ-Kontrollen wurden GST-Jun1-233 (50 kD) und GST-Pias3 (97 kD) und als Kinase-Negativ-Kontrollen GST und GST-Pim-1-K67M verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente die PM C-TAK1-N183A (107 kD). Weiter ist in Abbildung 2.24b gezeigt, dass die beiden kurzen Deletions-Mutanten C-TAK1-111 und 81-178 von Pim-1-wt-Flag nicht phosphoryliert wurden (die Verwendung von GST-Pim-1-wt führte zum gleichem Ergebnis, Daten nicht gezeigt), obwohl die C-TAK1-81-178 Mutante noch die Pim-1-Interaktions-Domäne (AS 112-165) beinhaltet. Da aber die C-TAK1-165-Mutante phosphoryliert wurde (Abb.2.24c), konnte davon ausgegangen werden, dass außer einer weiter zum C-terminalen Ende hin gelegenen AS (C-TAK1-N-del; potentielle Pim-1-Phosphorylierungs-Stellen: AS 484-PERKKSSST-491 und 569-PRERRTA-574) auch N-terminale AS-Reste phosphoryliert werden müssen. Die Position dieser AS-Reste musste weiter im 5'-Bereich als AS-Position 81 gelegen sein, da die C-TAK1-81-178-Mutante nicht phosphoryliert wird. Um den Bereich noch weiter einzugrenzen wurden weitere Deletions-Mutanten von C-TAK1 hergestellt. Dabei handelte es sich um N-terminal verkürzte Deletions-Mutanten, die an den AS 4, 11, 24 und 37 begannen und den Bereich bis zur AS 165 überspannten. Eine schematische Darstellung aller verwendeten C-TAK1-Proteine/Deletionen ist in Abbildung 2.25 gezeigt. Alle Deletions-Mutanten, die an der AS 165 enden, wurden phosphoryliert (Abb.2.24c). Weiter war auffällig, dass aber das isolierte Ratten-Protein C-TAK1-Y6131 (das C-TAK1-Y6131-Protein enthält vier unterschiedliche AS im Vergleich zum humanen Protein C-TAK1) und eine um 34 AS verlängerte humane C-TAK1-Mutante von Pim-1-wt nicht phosphoryliert werden konnten. Allerdings wurden humane C-TAK1-Deletions-Mutanten, die bis zur AS 230 oder 207 verkürzt worden waren, durch Pim-1-wt phosphoryliert (Abb.2.24c). Gleiche Experimente wurden auch mit Pim-1-wt-Flag durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

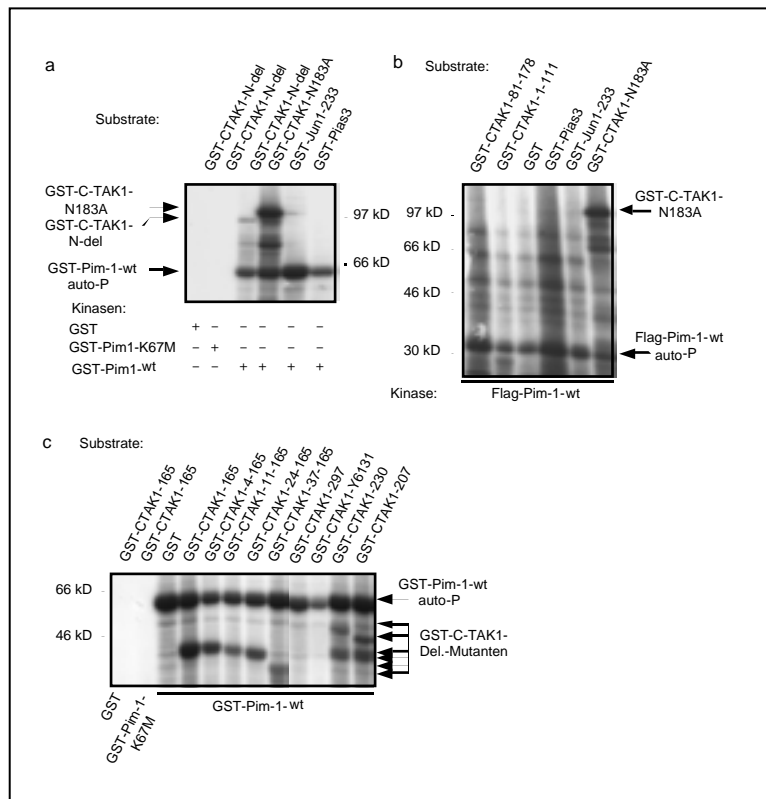


Abb.2.24 C-TAK1 wird an mehreren AS-Resten durch Pim-1-wt phosphoryliert

Alle dargestellten GST-Proteine wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Flag-Pim-1-wt wurde aus mit Flag-Pim-1-wt transfizierten COS7-Zellen immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde als Kinase verwendet. Mit den angegebenen Proteinen wurden Kinase-Experimente durchgeführt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Autoradiographie detektiert. a: Eine C-TAK1-Mutante, die ab AS 81 beginnt wird von Pim-1-wt phosphoryliert. Die Mutante besitzt keine Fähigkeit zur Autophosphorylierung und wird auch nicht durch GST oder GST-Pim-1-K67M phosphoryliert. C-TAK1-N183A diente als Positiv-Kontrolle und GST-Jun1-233 und Pias3 als Negativ-Kontrollen.

b: Pim-1-wt-Flag phosphoryliert weder die C-TAK1 1-111 noch die C-TAK1-81-178 Deletions-Mutante. C-TAK1-N183A diente als Positiv-Kontrolle und GST, GST-Jun1-233 und GST-Pias3 als Negativ-Kontrollen. c: Pim-1-wt phosphoryliert alle N-terminal verkürzten C-TAK1-Deletionen. Während die C-TAK1-207/230 Mutanten phosphoryliert werden, ist dies bei den beiden größeren C-TAK1-Y6131 und C-TAK1-297-Mutanten nicht der Fall. Während GST als Substrat-Negativ-Kontrolle diente, wurden GST und GST-Pim-1-K67M als Kinase-Negativ-Kontrollen verwendet.

Die erhaltenen Daten zeigten, dass Pim-1 mehrere AS des humanen C-TAK1-Protein phosphorylieren kann. Innerhalb der ersten 80 AS im N-Terminus sind sieben Serine und neun Threonine lokalisiert, von denen eines oder mehrere phosphoryliert werden könnten. Ein weiterer Bereich erstreckt sich über die AS 179-729. Dieser Bereich enthält auch das potentielle Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv. Während die Pim-1-Interaktions-Domäne in dem Bereich zwischen den AS 112-165 lokalisiert ist, konnte die C-TAK1/C-TAK1-Interaktions-Domäne auf die AS 81-111 eingegrenzt werden.

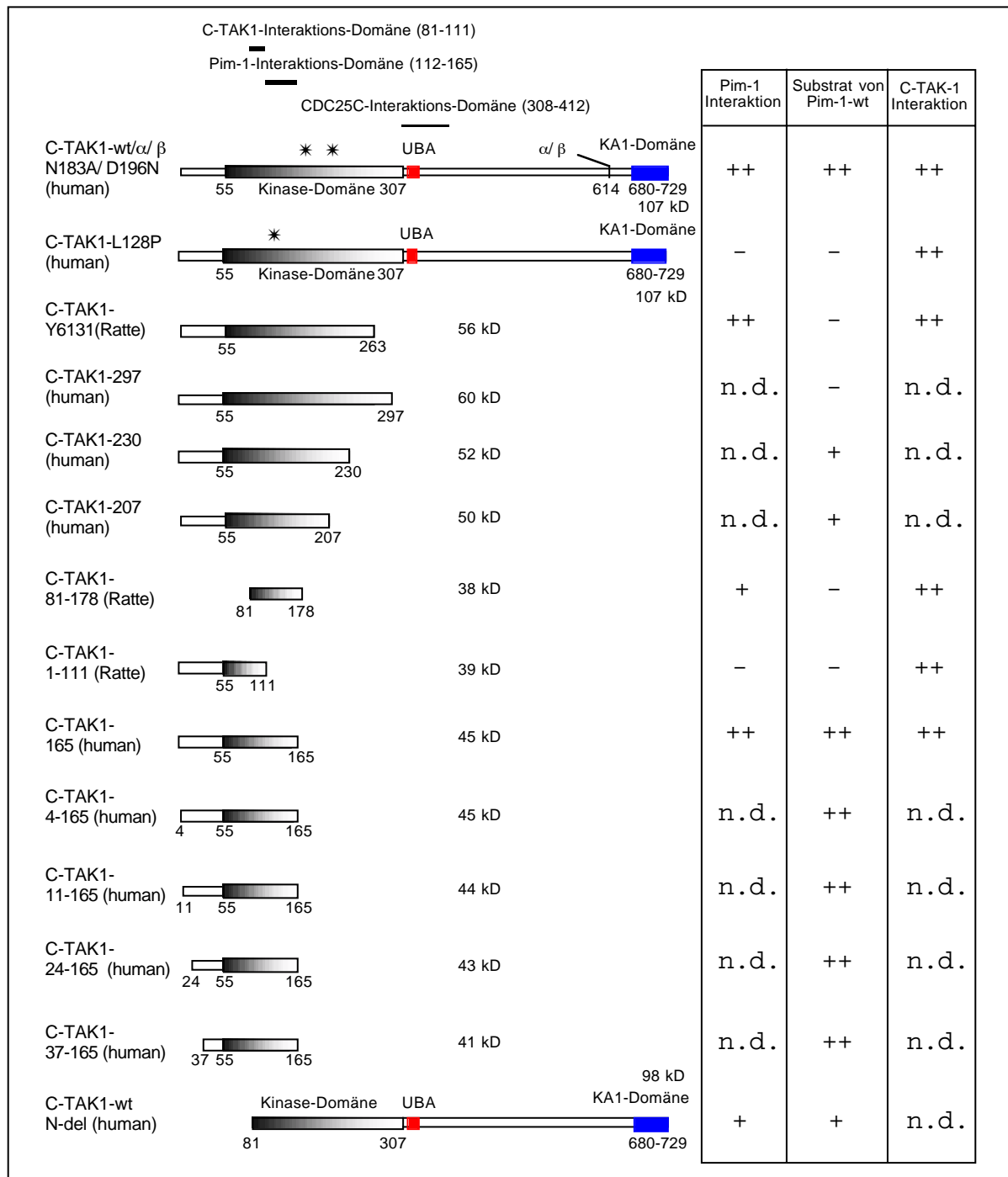


Abb.2.25 Schematische Darstellung der C-TAK1-GST-Proteine/Deletionen

Dargestellt sind alle verwendeten GST-C-TAK1-Proteine. Aus den Daten geht hervor, inwieweit die C-TAK1-Proteine/Mutanten mit C-TAK1 oder Pim-1 interagieren bzw. von Pim-1-wt phosphoryliert werden. Nur C-TAK1-wt, α und β sind zur Autophosphorylierung in der Lage. Es sind sowohl die veröffentlichte CDC25C- (Peng *et al.*, 1998), die Pim-1- als auch die C-TAK1-Interaktions-Domäne markiert. Das Molekulargewicht ist inklusive GST-Anteil angegeben. UBA: AS 328-364; Ubiquitin-assoziierte Domäne, KA-1: AS 680-729; Kinase-assoziierte Domäne 1.

2.7.4. CDC25C wird durch Pim-1-wt phosphoryliert

Es war bekannt, dass die Phosphatase CDC25C durch C-TAK1 an der AS Ser216 phosphoryliert und durch Rekrutierung von sogenannten 14-3-3-Adapter-Proteinen inaktiviert wird. CDC25C benötigt allerdings N-terminale Phosphorylierungen, um aktiviert zu werden. Diese Aussage wurde überprüft, indem verschiedene CDC25C-Deletions-Mutanten und die PM CDC25C-S216A als Substrat in Kinase-Experimenten eingesetzt wurden (Abb.2.26). Eine der Deletions-Mutanten beinhaltete die AS 1-211, die zweite die ersten 235 AS und die dritte begann ab AS 180 und beinhaltete den CDC25C-Protein-Anteil bis zum Stopp-Codon. In einer weiteren Mutante wurde die AS Serin an der Position 216 gegen Alanin ausgetauscht. So wurde eine PM hergestellt, die von C-TAK1 nicht mehr phosphoryliert werden kann (Peng *et al.*, 1998). In welchem Maße sowohl Pim-1 als auch C-TAK1 mit den jeweiligen CDC25C-Proteinen interagieren konnten und ob diese von Pim-1 bzw. C-TAK1 phosphoryliert wurden, ist in Abbildung 2.26 dargestellt.

Es wurde bereits gezeigt, dass Pim-1-wt die Phosphatase CDC25C phosphoryliert, obwohl CDC25C nur eine abgewandelte Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv in der NLS-Sequenz enthält (240-KVKKKYFSG-248). In Abb.2.26b und c ist gezeigt, dass sowohl Pim-1-wt-GST als auch immunopräzipitiertes Pim-1-wt-Flag-Protein aus Pim-1-wt-Flag transfizierten COS7-Zellen in der Lage waren, sowohl CDC25C als auch alle drei Deletions-Mutanten zu phosphorylieren. Da die CDC25C-180-474-Mutante ungefähr das gleiche Molekulargewicht besitzt wie Pim-1-wt-GST, war deren Detektion aufgrund der Autophosphorylierung bei Verwendung des GST-Pim-1-wt-Proteins erschwert, was durch Verwendung von immunopräzipitiertem Flag-Pim-1-wt Protein umgangen werden konnte. Als Positiv-Kontrolle diente GST-C-TAK1, als Negativ-Kontrolle GST. Weiter zeigten die Experimente, dass Pim-1-wt eine andere AS als Ser216 des CDC25C-Proteins phosphoryliert. Während C-TAK1 nicht in der Lage war, die CDC25C-S216A-PM zu phosphorylieren, war bei Pim-1-wt zwischen CDC25C-wt und CDC25C-S216A kein Unterschied zu erkennen (Abb.2.26e).

Von der Kinase C-TAK1-wt-Flag (immunopräzipitiertes Flag-Protein aus C-TAK1-wt-Flag transfizierten COS7-Zellen) wurden CDC25C-wt und die beiden Deletions-Mutanten CDC25C-235 und CDC25C-180-474 phosphoryliert. Diese beinhalten alle die AS Ser216 (Abb.2.26a, d).

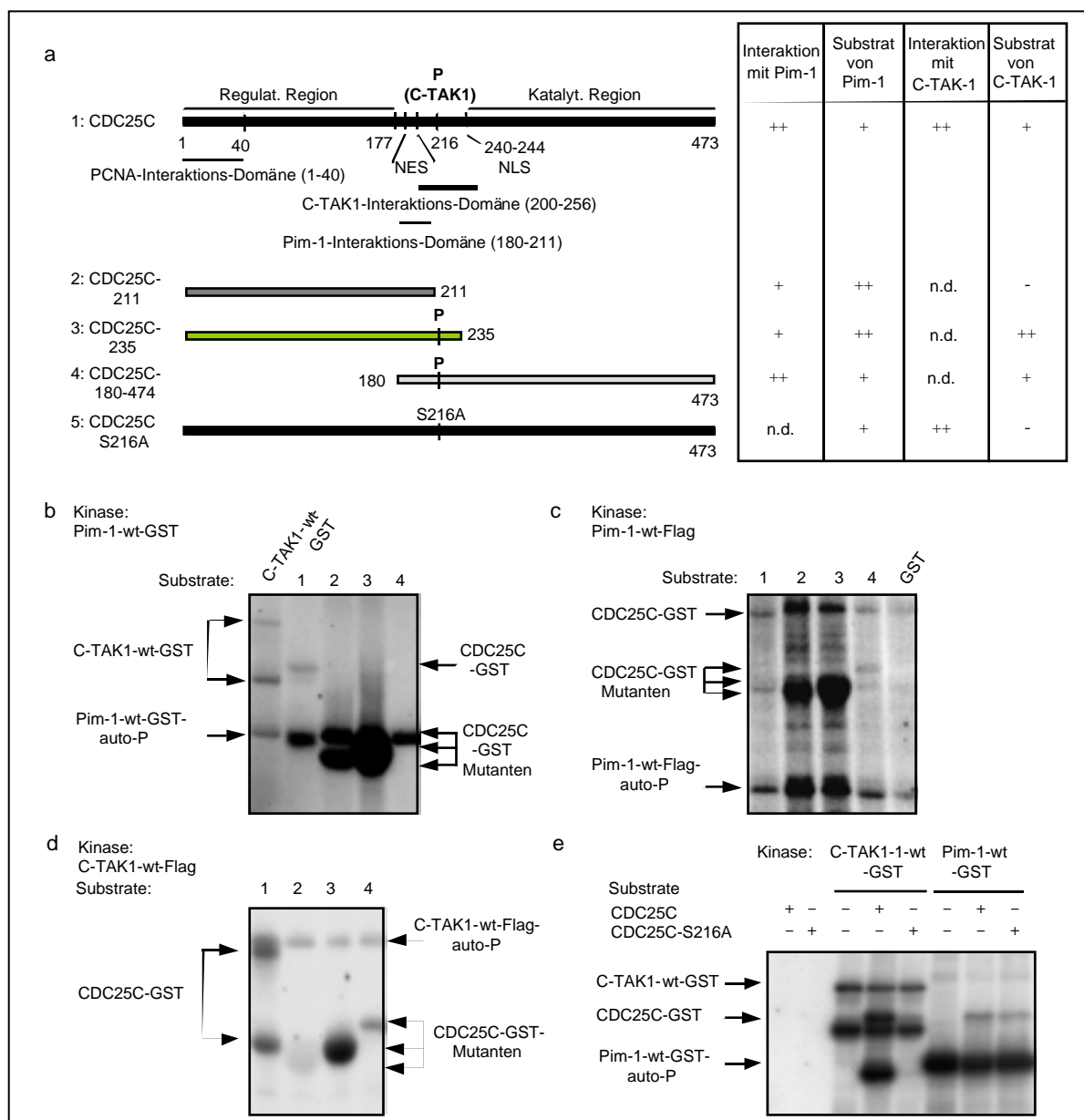


Abb.2.26 Pim-1-wt phosphoryliert CDC25C *in-vitro* an einem oder mehreren Serin- oder Threonin-Resten, aber nicht an der AS Ser216

Unterschiedliche GST-CDC25C-Deletions- oder Punktmutanten sind für die *in vitro* Kinase-Experimente als Substrat verwendet worden. a: Schematische Darstellung von CDC25C und den CDC25C-Deletions- oder Punktmutanten sowie ein Überblick über die Pim-1/CDC25C-Interaktion, C-TAK1/CDC25C-Interaktion und die Phosphorylierung von CDC25C durch Pim-1-wt und C-TAK1. b/c: Sowohl GST-Pim-1-wt als auch immunopräzipitiertes Flag-Pim-1-wt aus Pim-1-wt-Flag transfizierten COS7-Zellen phosphorylieren alle CDC25C-wt und Deletions-Mutanten. d: C-TAK1 phosphoryliert alle CDC25C-Proteine, die die AS Ser216 enthalten (Peng *et al.*, 1998). e: C-TAK1 phosphoryliert CDC25C am Ser216. Pim-1 phosphoryliert CDC25C an einem oder mehreren Serin- oder Threonin-Resten, aber nicht an der AS Ser216.

Die Experimente zeigten, dass die Interaktions-Domäne auf Seiten des CDC25C-Proteins in Bezug auf Pim-1 von den AS 180 und 211 begrenzt wird. In der Region zwischen den AS 180 und 211 sind 4 Serin-Reste vorhanden, die phosphoryliert werden könnten. Während C-TAK1 die Phosphatase CDC25C an der AS Ser216 phosphoryliert, wird diese von Pim-1-wt an einem oder mehreren Serinen oder Threoninen, aber nicht an Ser216, phosphoryliert. Dabei korreliert die Interaktionsstärke zwischen Pim-1/CDC25C nicht mit dem durch Pim-1 verursachten Phosphorylierungsstatus.

2.8. Endogene Expression von Pim-1, C-TAK1 und CDC25C

Die bisherigen Ergebnisse beruhten auf Überexpression in Zellen oder sind *in-vitro* durchgeführt worden. Es war daher von Interesse zu untersuchen, ob auch die endogenen Proteine Pim-1, C-TAK1 und CDC25C miteinander interagieren bzw. kolokalisiert in der Zelle vorliegen. Pim-1 konnte endogen in U 937-Zellen detektiert werden. Die U 937-Zelllinie ist eine monocytäre leukämische Zelllinie, die durch Phorbol ester (TPA)-Stimulierung zu Makrophagen differenziert. Bei diesem Prozess kommt es zur Akkumulierung von Pim-1 (Abb.2.27a). Es ist nicht geklärt, ob es sich dabei um eine erhöhte Transkription/Translation handelt oder um eine Inhibierung der Degradation. Pim-1 war bis zu vier Tagen nach Stimulierung nachzuweisen (Abb.2.27b). Während in NIH 3T3-Zellen nur endogenes Pim-1 detektiert werden konnte, war es in Hela- und K 562-Zellen möglich, alle drei Proteine endogen nachzuweisen (Abb.2.27b). Ebenso wurden Immunopräzipitationen von Lysaten der oben genannten Zellen zum Nachweis endogener Proteine durchgeführt. Als Kontrolle wurde im Immunoblot der AK verwendet, der auch für die Immunopräzipitationen verwendet worden war. C-TAK1 war auch im Immunopräzipitat von sowohl α -Pim-1 als auch von α -CDC25C nachzuweisen. Dieses bestätigte die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen. Weiter konnte Pim-1 im Immunopräzipitat von α -CDC25C detektiert werden und umgekehrt. Bei Detektion des endogenen CDC25C-Proteins kam erschwerend hinzu, dass das CDC25C-Protein im Immunoblot ungefähr das gleiche Molekulargewicht wie die große IgG-Bande aufwies.

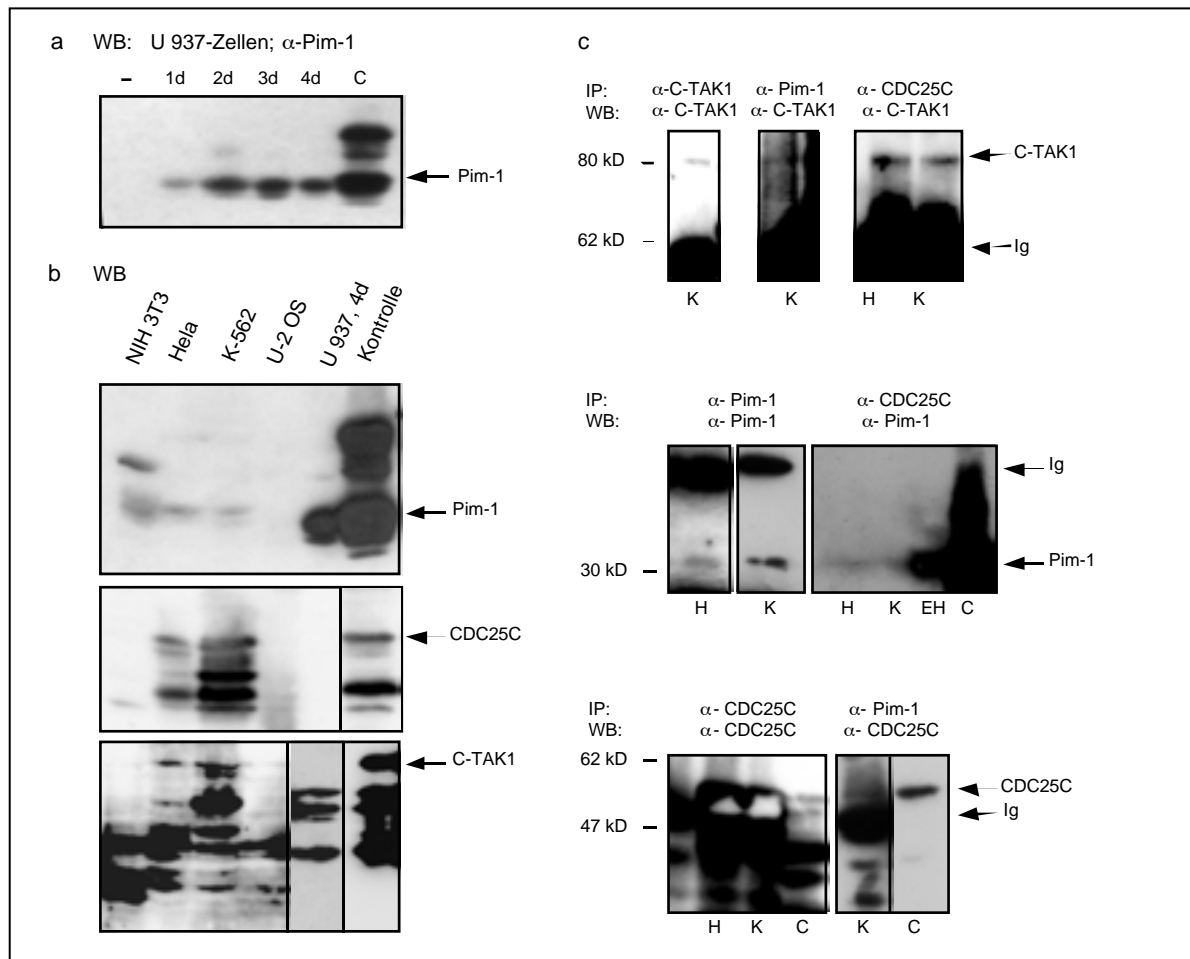


Abb.2.27 Nachweis der endogenen Proteine im Immunoblot und in der Immunopräzipitation

a: U 937-Zellen wurden mit 100 nM TPA für angegebene Tage stimuliert, die Proteine isoliert und im Immunoblot auf die Expression von Pim-1 untersucht. Über einen Zeitraum von vier Tagen ist Pim-1 nachzuweisen. b: Verschiedene Zelllinien wurden auf die endogene Expression von Pim-1, CDC25C und C-TAK1 untersucht. Sowohl in HeLa- als auch in K 562-Zellen sind Pim-1, CDC25C und C-TAK1 nachzuweisen. c: C-TAK1 kann in allen endogenen Immunopräzipitaten von C-TAK1, Pim-1 und CDC25C nachgewiesen werden. Weiter ist es möglich, Pim-1 im Immunopräzipitat von CDC25C zu detektieren und anders herum. H: HeLa-Zellen, K: K 562-Zellen, EH: HeLa-Zellysat, C: Kontrolle (Zellysat von entsprechend transfizierten COS7-Zellen), WB: Immunoblot, IP: Immunopräzipitation.

HeLa- und K 562-Zellen wurden auch zum Nachweis der endogenen Proteine in der Immunfluoreszenz verwendet. Das Lokalisations-Muster der Proteine Pim-1, C-TAK1 und CDC25C wurde unter Verwendung der entsprechenden AK untersucht. In Abbildung 2.28a sind als Kontrollen die mit dem jeweiligen 2. AK versetzten Zellen gezeigt. Als weitere Negativ-Kontrolle wurde der α -Gfi-1-AK verwendet, da aus eigenen Arbeiten bekannt war, dass in HeLa- und K 562-Zellen kein Gfi-1 exprimiert wird. Sowohl in HeLa- als auch in K 562-Zellen waren alle drei endogenen Proteine größtenteils cytoplasmatisch lokalisiert. Pim-1 war sowohl mit C-TAK1 als auch mit CDC25C kolokalisiert. Die Kolokalisation von C-TAK1 und CDC25C diente als Positiv-Kontrolle (Abb.2.28b).

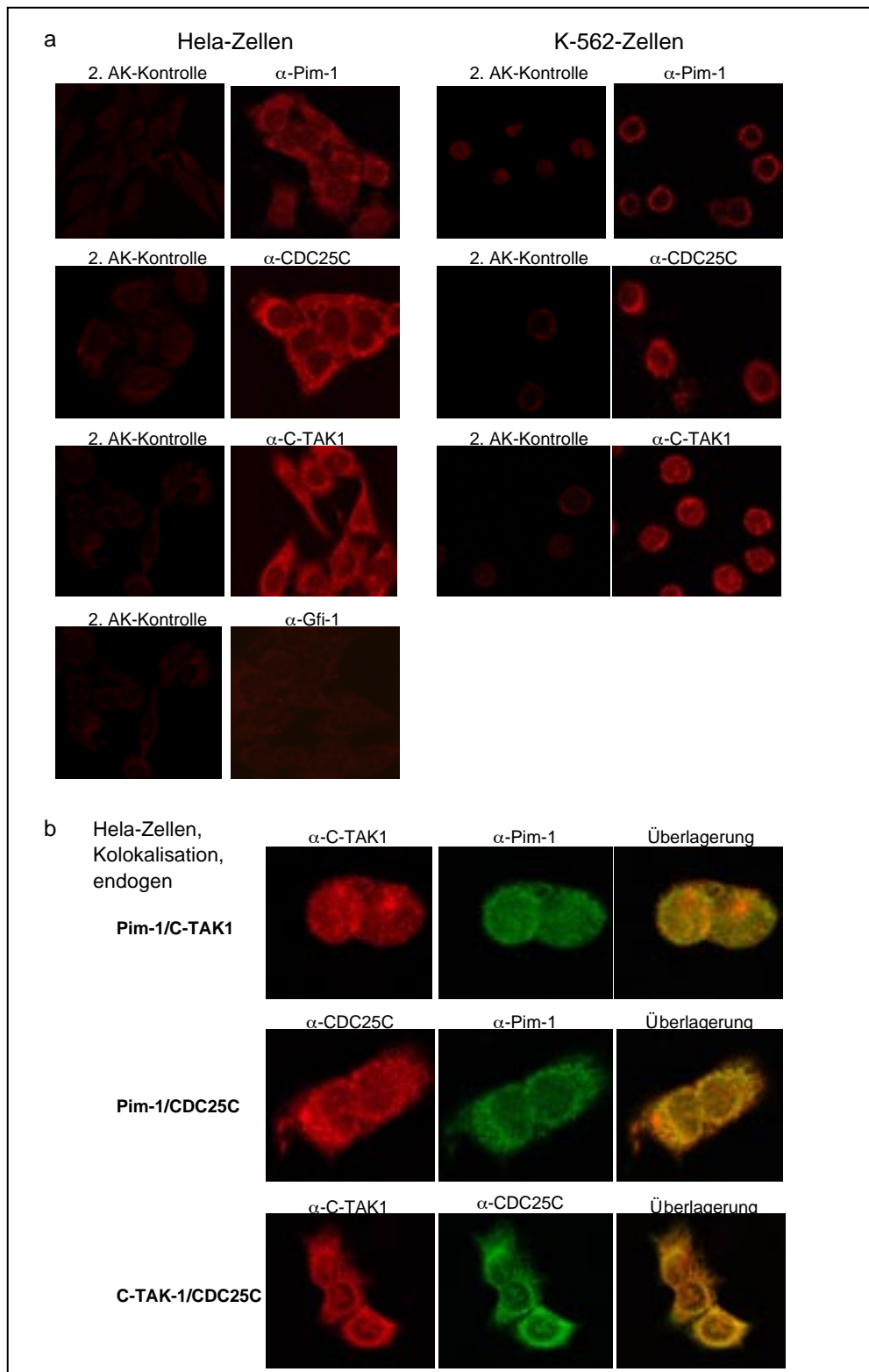


Abb.2.28: Detektion von endogenen Pim-1, C-TAK1 und CDC25C

a: HeLa- und K 562-Zellen wurden mit α -Pim-1, α -CDC25C, α -C-TAK1 oder α -Gfi-1 und mit den jeweiligen TRITC-markierten 2. AK in der Immunfluoreszenz gefärbt. Als Negativ-Kontrollen wurden nur die jeweiligen TRITC-markierten 2. AK verwendet. Alle Proteine sind cytoplasmatisch lokalisiert. Gfi-1 wird in HeLa-Zellen nicht exprimiert. b: HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen AK und den spezifischen TRITC oder FITC-markierten 2. AK immunhistochemisch gefärbt. Sowohl Pim-1/C-TAK1 als auch Pim-1/CDC25C sind kolokalisiert. Die Kolokalisation von C-TAK1/CDC25C diente als Positiv-Kontrolle.

2.9. Pim-1 verringert die C-TAK1-Kinase-Aktivität

Es ist bekannt, dass CDC25C durch Phosphorylierung an der AS Ser216 durch C-TAK1 inaktiviert wird (Peng *et al.*, 1998). Zu untersuchen galt folglich, ob C-TAK1 durch die Phosphorylierung durch Pim-1-wt inaktiviert wird, so dass eine indirekte aktivierende Wirkung in Bezug auf CDC25C auftritt. Dabei konnte allerdings der Effekt der Autophosphorylierung nicht berücksichtigt werden, da alle C-TAK1-Kinasen, die sich nicht autophosphorylieren konnten, keine Aktivität zeigten. Zwei aufeinanderfolgende Kinase-Experimente wurden angeschlossen, um den Inaktivierungs-Mechanismus aufzuklären. Im ersten Kinase-Versuch diente C-TAK1 als Substrat und aufgereinigte und eluierte GST-Pim-1-wt/-K67M-Proteine als Kinasen. In Abbildung 2.29 ist zu sehen, dass C-TAK1 selbst stärker phosphoryliert war, wenn im 1. Kinase-Experiment Pim-1-wt eingesetzt worden war (1. Spur im Vergleich zur 2. Spur). Pim-1-K67M war nicht in der Lage, C-TAK1 inaktivierend zu phosphorylieren. Weiterhin ist im 2. Kinase-Experiment gezeigt, dass die Aktivität der phosphorylierten C-TAK1-Kinase in Bezug auf die Phosphatase CDC25C herabgesetzt war (Abb.2.29, 1. Spur im Vergleich zur 2. Spur). Dieses war sowohl beim CDC25C-GST-Vollängen-Protein als auch bei dem typischen niedermolekularen Protein zu sehen. C-TAK1, welches das erste Kinase-Experiment ohne Pim-1 durchlief, war in der Lage CDC25C zu phosphorylieren (Abb.2.29, Spur 3). Als Positiv-Kontrolle wurde C-TAK1 erst im 2. Kinase-Experiment eingesetzt (Abb.2.29, Spur 4). CDC25C allein zeigte keine Autophosphorylierung (Abb.2.29, Spur 5). Das Experiment wurde drei Mal unabhängig voneinander mit identischen Ergebnissen durchgeführt. Die Abbildung 2.29 zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente.

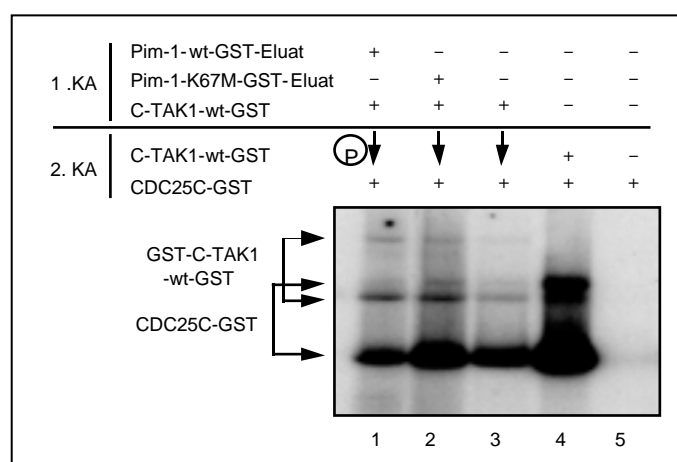


Abb.2.29 Inaktivierung von C-TAK1 durch Pim-1-Phosphorylierung *in vitro*

GST-Proteine wurden in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. GST-Pim-1-Proteine wurden eluiert. Nach einem ersten Kinase-Experiment (C-TAK1 als Substrat von Pim-1) wurde in einem 2. Kinase-Experiment CDC25C durch die (phosphorylierte) C-TAK1-Kinase phosphoryliert. Die C-TAK1-Kinase-Aktivität in Bezug auf CDC25C war erniedrigt, wenn im ersten Kinase-Versuch Pim-1-wt als Kinase eingesetzt worden war (Spur 1). Die Phosphorylierung von C-TAK1 durch Pim-1 war erhöht. Die kinase-inaktive Mutante

Pim-1-K67M konnte C-TAK1 nicht phosphorylieren, wodurch die C-TAK1-Kinase-Aktivität in Bezug auf CDC25C im 2. Kinase-Experiment erhöht war (Spur 2). C-TAK1 wurde zusätzlich als Kontrolle verwendet (Spur 3 und 4). CDC25C ist nicht zur Autophosphorylierung fähig (Spur 5).

2.10. Pim-1 erhöht die CDC25C-Phosphatase-Aktivität

Die Phosphorylierung der AS Ser216 ist dafür verantwortlich, dass CDC25C letztendlich durch Rekrutierung von 14-3-3 Adapter-Proteinen inaktiviert wird. Dieses geschieht durch C-TAK1 oder die DNA-Schäden-Erkennungs-Kinasen chk1 und cds1. C-TAK1 ist allerdings über den ganzen Zellzyklus hinweg exprimiert (Peng *et al.*, 1998). Bisher war nicht bekannt, wie C-TAK1 reguliert werden kann.

CDC25C benötigt, um aktiv zu werden, N-terminale Phosphorylierungen. Dieses geschieht sowohl durch die Polo-like-Kinase 1 als auch in einem rückwirkenden Mechanismus durch den schon teilweise phosphorylierten CyclinB/cdk1-Komplex (Abrieu *et al.*, 1998; Cogswell *et al.*, 2000; Kumagai und Dunphy, 1996; Qian *et al.*, 2001; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002). Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass Pim-1 in der Lage ist, C-TAK1 durch Phosphorylierung zu inaktivieren. Gleichzeitig wurde aber auch gezeigt, dass CDC25C durch Pim-1 phosphoryliert wird. Somit war es von großem Interesse zu untersuchen, ob die Phosphorylierung durch Pim-1 einen Einfluss auf CDC25C-Phosphatase-Aktivität besitzt. Es war bekannt, dass Pim-1 mit der verwandten Phosphatase CDC25A interagiert, diese phosphoryliert und die Phosphatase-Aktivität um das dreifache erhöht (Mochizuki *et al.*, 1999). CDC25A ist eine Phosphatase, der eine bedeutende Rolle im Zellzyklus an dem G₁/S Kontrollpunkt zukommt. CDC25C ist der gleichen Protein-Familie zuzuordnen, allerdings am G₂/M-Kontrollpunkt von großer Bedeutung (Peng *et al.*, 1998.). Um einen Effekt durch die Pim-1 vermittelte CDC25C-Phosphorylierung zu zeigen, wurden Phosphatase-Aktivitäts-Experimente durchgeführt. Dem Phosphatase-Aktivitäts-Experiment wurde ein Kinase-Experiment vorgeschaltet, um die Unterschiede zwischen phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Phosphatase aufzuzeigen. Zur Kontrolle wurde die Aktivität der jeweiligen Kinasen mit radioaktiv-markierten [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP überprüft (Daten nicht gezeigt, vergleichbar mit Abb.2.26b/c/e). Das dem Phosphatase-Experiment vorgeschaltete Kinase-Experiment wurde mit und ohne ATP durchgeführt. Als Kinasen wurden GST-Pim-1-wt, die kinase-inaktive Mutante GST-Pim-1-K67M und GST eingesetzt. Um die relative eigene Phosphatase-Aktivität zu bestimmen, war nur CDC25C-GST verwendet worden. Der Einsatz von CDC25A anstelle von CDC25C diente als Positiv-Kontrolle (Mochizuki *et al.*, 1999). Als Substrat wurde das chromogene Substrat p-Nitrophenyl-Phosphat (p-NPP), welches strukturell mit Phospho-Tyrosin verwandt ist, verwendet. Die in dem Phosphatase-Experiment erhaltenen Aktivitäten wurden durch Bezug auf die relative Phosphatase-Aktivität von CDC25C und CDC25A ermittelt. Die Standardabweichungen wurden im Falle von CDC25C und CDC25C/Pim-1-wt aus n=6, von CDC25C/Pim-1-K67M und CDC25C/GST aus n=4 und im Falle von CDC25A und CDC25A/Pim-1-wt aus n=3 unabhängigen Experimenten berechnet. Die Phosphatase-Aktivität von GST-CDC25C erhöhte sich vom Basal-Level nach

Prä-Inkubation mit GST-Pim-1-wt um das dreifache, nicht aber mit GST alleine, so dass angenommen werden kann, dass Pim-1-wt die Phosphatase CDC25C aktiviert. Die Aktivierung von CDC25C war abhängig von der Phosphorylierung durch die Pim-1-Kinase, da Pim-1-wt in Abwesenheit von ATP nicht in der Lage war, die Aktivität von CDC25C zu erhöhen. Die kinase-inaktive Mutante Pim-1-K67M war trotz Anwesenheit von ATP nicht in der Lage, die Phosphatase-Aktivität von CDC25C zu steigern. Die Phosphatase-Aktivität von CDC25A wurde durch Pim-1-wt ebenfalls erhöht.

Somit konnte gezeigt werden, dass Pim-1 die Phosphatase CDC25C sowohl indirekt (durch Inhibierung von C-TAK1) als auch direkt durch Phosphorylierung aktiviert.

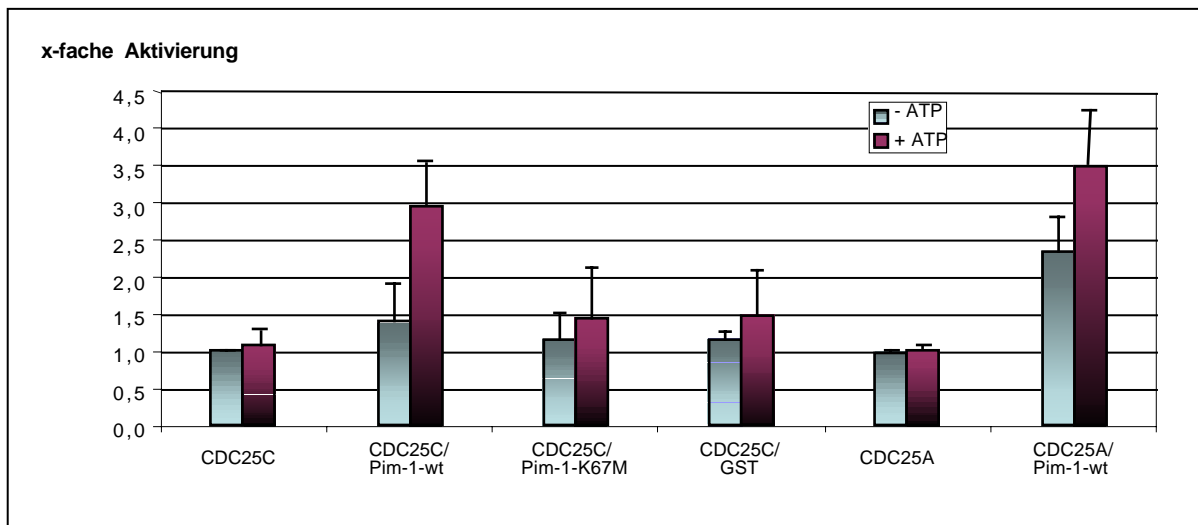


Abb.2.30 Phosphorylierungs-vermittelte Aktivierung der CDC25C-Phosphatase durch die Pim-1-Kinase

GST-Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und unter Kinase-Bedingungen zusammengegeben. Die Kinase-Reaktion wurde gestoppt und die Phosphatase-Aktivität von CDC25C in der gleichen Reaktion unter Verwendung des chromogenen Substrates p-Nitrophenyl-Phosphat (p-NPP) bestimmt. Der Graph zeigt die Phosphatase-Aktivitäten relativ zu CDC25C in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von ATP und GST-Proteinen. Pim-1-wt ist in der Lage, die CDC25C-Phosphatase-Aktivität um das dreifache durch Phosphorylierung zu erhöhen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus n=6 (CDC25C und CDC25C/Pim-1-wt), n=4 (CDC25C/Pim-1-K67M und CDC25C/GST) und im Falle von CDC25A und CDC25A/Pim-1-wt aus n=3 unabhängigen Experimenten.

3. Diskussion

3.1. Isolierung von C-TAK1

Um neue Interaktionspartner von Pim-1 zu isolieren, wurde das neuartige Hefe-Interaktions-System (engl.: **Ras Recruitment System**, RRS) verwendet. Die Interaktion von Pim-1 und dem isolierten C-TAK1-Protein konnte im herkömmlichen Hefe-Interaktions-System (engl.: Yeast Two Hybrid) bestätigt werden. Bei der Isolation des humanen C-TAK1-Proteins aus einer humanen Milz-cDNA-Bibliothek wurden drei Spleiß-Varianten identifiziert. Dabei handelte es sich um die schon veröffentlichte C-TAK1-Sequenz (Peng *et al.*, 1998), nachfolgend als C-TAK1-wt bezeichnet, und zwei weitere Spleiß-Varianten, die als C-TAK1- α (Exon X (9 AS) und Exon Y (15 AS)) und β (Exon Y, 15 AS) bezeichnet wurden. Diese beiden Exons sind zwischen dem 16. und 17. Exon des C-TAK1-Proteins in einer nicht näher definierten Protein-Region inseriert. Es wurde allerdings keine Spleiß-Variante gefunden, die nur das Exon X (9 AS) beinhaltet, was allerdings nicht ausschließt, dass diese Spleiß-Variante in anderen Geweben exprimiert wird. Die in Hefe gefundene Interaktion mit dem N-terminalen C-TAK1-Fragment konnte mit den verschiedenen Spleiß-Varianten des humanen C-TAK1-Vollängen Proteins in allen durchgeführten biochemischen Experimenten bestätigt werden. Als interne Kontrolle diente eine mit Pim-1 nicht-interagierende Punktmutante (PM) C-TAK1-L128P.

Während die Arbeitsgruppe von Piwnica-Worms zwei C-TAK1-Proteine von fast gleichem Molekulargewicht (Doppelsignal im Immunoblot) in Hela- und in Jurkat-Zellen nachweisen konnte, konnte in der vorliegenden Arbeit C-TAK1 nur als einfaches Signal in K 562- und Hela-Zellen endogen nachgewiesen werden. Die Gruppe von Piwnica-Worms führte diese Beobachtung auf unterschiedliche Phosphorylierungs-Stadien des C-TAK1-Proteins zurück (Peng *et al.*, 1998). Es ist jedoch möglich, dass es sich dabei um verschiedene Spleiß-Varianten handelt. Zumindest sind die geringen Größenunterschiede der Spleiß-Varianten in den mit C-TAK1-Expressionskonstrukten transfizierten COS7-Zellen sichtbar. Die Spleiß-Varianten zeigten in ihrem Verhalten gegenüber Pim-1 keine Unterschiede. Als Kontrolle wurden die drei Spleiß-Varianten auf ihre Kinase-Aktivität in Bezug auf die Phosphatase CDC25C getestet. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen C-TAK1-wt und den Spleiß-Varianten aufgezeigt werden. Viele weitergehende Versuche wurden aufgrunddessen nur noch mit C-TAK1-wt durchgeführt.

3.2. Interaktion zwischen Pim-1 und C-TAK1

Die Interaktion zwischen Pim-1 und dem humanen C-TAK1 wurde durch biochemische Untersuchungen, wie GST-Interaktions-Experimente, Immunopräzipitationen, Immunfluoreszenzen und Kinase-Experimente bestätigt. Dabei stellte sich u.a. heraus, dass in jedem Experiment die C-TAK1/C-TAK1-Interaktion am stärksten war. Die C-TAK1/C-TAK1-Interaktions-Domäne konnte auf einen kleinen Bereich von 30 AS eingegrenzt werden. So ist es naheliegend, dass C-TAK1 seine Aktivität als Dimer/Multimer entfaltet. Im Falle von Pim-1 kann ebenfalls von dieser Annahme ausgegangen werden, da in jedem Interaktions-Experiment Pim-1 auch mit einem anderen Pim-1-Protein interagiert. Es lässt sich allerdings bei keinem von beiden Proteinen eine Aussage darüber machen, ob ein einzelnes Protein zur Autophosphorylierung fähig ist oder ob die Phosphorylierung von einem gebundenen zweiten Protein herrührt.

3.2.1. Inaktivierung von C-TAK1

CDC25C wird von C-TAK1 am Ser216 phosphoryliert und durch Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen inaktiviert. Durch die Inaktivierung des CDC25C-Proteins wird der Zellzyklus am G₂/M-Kontrollpunkt blockiert. Die durch DNA-Schäden aktivierten Kinasen chk1/cds1 phosphorylieren die gleiche AS des CDC25C-Proteins (Blasina *et al.*, 1999; Furnari *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1997). Somit kann davon ausgegangen werden, dass unter genotoxischem Stress dieser Kontrollpunkt in einem noch viel stärkeren Maße blockiert wird. Der Block findet auf verschiedenen Ebenen statt. In Abb.1.4 der Einleitung war schon zu sehen, dass durch das Tumorsuppressor-Protein p53 die Expression des Adapter-Proteins 14-3-3 verstärkt und die CDC25C-Expression erniedrigt wird (Krause *et al.*, 2001). Die CDC25C-aktivierende Kinase Plk1 wird durch Ubiquitinierung inaktiviert (Kang *et al.*, 2002) und auf Ebene des Cyclin B1/cdk1-Komplexes wird der inhibierende Effekt durch die Aktivierung von Wee1 verstärkt (Takizawa und Morgan, 2000). Dieser Block dauert so lange an, bis auf der DNA-Ebene alle Schäden repariert sind. Es war bisher völlig unklar, wie C-TAK1 reguliert wird. Nach dem bisherigen Modell, dürfte der G₂/M-Block nicht überschritten werden, da C-TAK1 über den gesamten Zellzyklus exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pim-1-Kinase C-TAK1 phosphoryliert. In der Tat wird die Kinase-Aktivität durch die Pim-1-Phosphorylierung herabgesetzt. Die abnehmende Kinase-Aktivität von C-TAK1 wurde über den Phosphorylierungs-Status von CDC25C gemessen. Allerdings bleibt anzumerken, dass C-TAK1 zwar ein Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv besitzt (AS 486-RKKSST-491), dieses aber nicht die einzige Phosphorylierungs-Stelle sein kann, da C-TAK1 auch am N-Terminus phosphoryliert wird. Die Entdeckung, dass Pim-1 die Kapazität besitzt, mit C-TAK1 stabile Komplexe zu bilden,

in-vitro zu phosphorylieren und dadurch zu inaktivieren, legt die Vermutung nahe, dass Pim-1 für die Regulation der biologischen Funktionen von CTAK1 verantwortlich ist. Somit könnte das Proto-Onkogen Pim-1 die Zellzyklusprogression beschleunigen, indem ein Inhibitor inaktiviert wird. Dieses stimmt mit den Daten überein, welche zeigen, dass Pim-1 in der Lage ist, den Zellzyklus in der DN3-Subpopulation der Thymozyten-Entwicklung zu beschleunigen (Leduc *et al.*, 2000; Shirogane *et al.*, 1999).

3.2.2. Modellmechanismus der C-TAK1-Inaktivierung

In Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, dass beide Pim-1-Proteine mit allen C-TAK1-Vollängen- und dem isolierten Protein der Ratte kolokalisiert vorliegen. Alle interagierenden C-TAK1-Proteine wiesen eine sowohl cytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisation auf.

Endogen wurden Pim-1 und C-TAK1 in Hela- und K 562-Zellen nur cytoplasmatisch kolokalisiert detektiert. Die Interaktion konnte auch mittels endogener Immunopräzipitationen gezeigt werden. Dennoch gibt die Überexpression der Proteine einen Hinweis auf die Interaktion der Proteine, da die nicht-interagierende Mutante (C-TAK1-L128P), ebenso wie die Negativ-Kontrolle Evi5mut, mit Pim-1 nicht kolokalisiert vorliegt. Bisher ist nicht geklärt, wie Pim-1 in den Zellkern gelangen kann, da in dem Pim-1-Protein keine NLS- Sequenz existiert. Da die inaktive Mutante Pim-1-K67M mit C-TAK1 den gleichen Kolokalisationseffekt aufweist wie Pim-1-wt, kann dieser nicht phosphorylierungs-abhängig sein. In Kinase-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Pim-1-wt nicht in der Lage ist, das verkürzte C-TAK1-Y6131-Protein (Ratte) zu phosphorylieren. Allerdings sind diese beiden Proteine ebenfalls im Zellkern und Cytoplasma kolokalisiert.

Andererseits konnte im C-TAK1-Inaktivierungs-Experiment definitiv gezeigt werden, dass die C-TAK1-Kinase durch Pim-1-Phosphorylierung inaktiviert wird. Wurde die inaktive Pim-1-K67M-Mutante verwendet, war die C-TAK1-Kinase-Aktivität nicht herabgesetzt. Somit wäre ein Mechanismus gefunden, der es ermöglicht, C-TAK1 durch eine posttranslationale Modifikation zu inaktivieren. Andererseits ist bisher noch unbekannt, wie C-TAK1 wieder dephosphoryliert und aktiviert werden kann.

Die Pim-1-Interaktions-Domäne des C-TAK1-Proteins konnte auf den AS-Bereich 81-165 eingegrenzt werden, in welchem sich auch die PM L128P befindet. C-TAK1 wird sowohl stromaufwärts (AS 1-80) als auch stromabwärts (AS 179-729) dieser Region phosphoryliert. Obwohl C-TAK1 keine definierte NES-Sequenz enthält und im C-terminalen Bereich zwei putative NLS-Sequenzen besitzt (AS 484-PERKKSSST-491 und 569-PRERRTA-575), weist C-TAK1 eine cytoplasmatische Lokalisation auf. Während erstere ein

Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv enthält ((K/R)₃-X-S/T-X; dabei ist X weder eine basische noch eine hydrophobe AS, Friedmann *et al.*, 1992), beinhaltet zweitens nur ein abgewandeltes Motiv. Im N-Terminus (AS 1-80) befindet sich kein Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv. Würde Pim-1 C-TAK1 in der NLS-Region phosphorylieren, könnte dieses eine Inhibierung des Kern-Importes zur Folge haben, da Importproteine nicht mehr an die NLS-Sequenz binden könnten. Andere mögliche Pim-1-Phosphorylierungs-Stellen sind von putativen leucin-reichen NES-Sequenzen umgeben. Die Phosphorylierung an einem Serin oder Threonin in einer solchen Domäne könnte eine Inhibierung des Exportes nach sich ziehen, da z.B. das Exportprotein Crm1 mit dem zu exportierenden Protein nicht mehr interagieren kann. Die Folge ist eine Akkumulation im Zellkern (Yang *et al.*, 1998).

Neben der direkten C-TAK1-Inaktivierung durch Pim-1, könnte ein weiteres Inaktivierungsmodell die räumliche Trennung von C-TAK1 und CDC25C sein. So könnte der Kern-Import von C-TAK1 mittels Phosphorylierung in der NLS-Region durch Pim-1 verhindert werden. Folglich könnte eine Inhibierung des nur im Zellkern vollständig aktiven CDC25C durch C-TAK1 ausgeschlossen werden. Allerdings steht dieses Modell im Widerspruch zu der zellulären Lokalisation von C-TAK1 und Pim-1 in den durchgeführten Kotransfektions-Experimenten. Die dort erhaltenen Ergebnisse deuten vielmehr auf eine Aktivierung von CDC25C im Cytoplasma hin, ohne dass C-TAK1 einen inhibierenden Einfluss ausüben kann.

3.3. Aktivierung von CDC25C durch Pim-1

Im Verlauf der Experimente stellte sich heraus, dass Pim-1 nicht nur mit C-TAK1, sondern auch mit CDC25C interagiert. Diese Interaktion wurde in GST-Interaktions-Experimenten entdeckt, welche zeigten, dass die Identifikation der verschiedenen Interaktionspartner abhängig von der verwendeten cDNA-Bibliothek und der entsprechenden Interaktionsstärke ist. Bestätigt wurde die Interaktion in Immunopräzipitationen, teilweise in Immunfluoreszenzstudien, in Kinase-Experimenten und in Phosphatase-Experimenten. CDC25C wurde sowohl in Transfektions-Experimenten als auch endogen im Cytoplasma detektiert. Nur bei Kotransfektion mit Pim-1-wt konnte CDC25C auch teilweise im Zellkern detektiert werden. Die nachgewiesene Kolo-kalisation kann auch ein Zellzyklus-abhängiger Effekt sein, da CDC25C während der Mitose im Zellkern lokalisiert ist. Pim-1 und CDC25C wurden auch in endogenen Komplexen nachgewiesen. In den Phosphatase-Experimenten konnte letztendlich die Aktivierung von CDC25C mittels Phosphorylierung durch Pim-1-wt gezeigt werden. Die inaktive Pim-1-K67M-Mutante war nicht in der Lage, CDC25C zu phosphorylieren und zu aktivieren. Die alleinige Bindung von Pim-1 trug nicht zu einer Erhöhung der Phosphatase-Aktivität bei.

Während Pim-1 am G₁/S-Kontrollpunkt die Phosphatase-Aktivität von CDC25A erhöht (Mochizuki *et al.*, 1999), ist CDC25C die verantwortliche Phosphatase am G₂/M-Kontrollpunkt (Takizawa und Morgan, 2000; Peng *et al.*, 1998). CDC25A wurde im Phosphatase-Experiment als Positiv-Kontrolle verwendet. Die Entdeckung, dass Pim-1 die Kapazität besitzt, die Phosphatase CDC25C *in vitro* zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren und die Beobachtung, dass die beiden Proteine stabile Komplexe bilden können, erlaubt es zu spekulieren, dass u.a. Pim-1 die biologische Funktion von CDC25C reguliert.

3.3.1. Mögliche Modellmechanismen der CDC25C-Aktivierung

Die Phosphorylierung von CDC25C an der AS Ser216 durch C-TAK1 (oder auch chk1/cds1) sorgt für die Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen (Peng *et al.*, 1998). Die AS Ser216 liegt in der Nähe der NES-Sequenz (190-ISDELMFSL-199, Konsensus: LXXXLXXLXL) und der NLS-Sequenz (240-KVKKK-244) (Graves *et al.*, 2001). Durch Bindung von 14-3-3-Adapter-Proteinen ist die NLS-Sequenz nicht mehr zugänglich für Importproteine und der CDC25C/14-3-3-Komplex bleibt cytoplasmatisch lokalisiert. Die Pim-1-Interaktions-Domäne wurde auf den AS-Bereich 180-211 eingegrenzt. Eine bestimmte AS, die von Pim-1-wt phosphoryliert wird, konnte nicht identifiziert werden. Ausgeschlossen werden konnte die Phosphorylierung der AS Ser216, was eine Inaktivierung von CDC25C zur Folge hätte.

CDC25C beinhaltet nur eine abgewandelte postulierte Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv, welches zum Teil in der NLS-Sequenz lokalisiert ist (240-KVKKKYFSG-248/ (K/R)₃-X-S/T-X). Während CDC25C allein cytoplasmatisch lokalisiert war, führte eine Kofunktion mit Pim-1-wt zu einer sowohl cytoplasmatischen als auch nukleären Lokalisation gleichermaßen wie zu einer rein cytoplasmatischen Lokalisation. In Gegenwart der Pim-1-K67M-Mutante, zeigte sich keine Kofunktion mit CDC25C. Ebenso ist die PM CDC25C-S216A weder mit Pim-1-wt noch mit Pim-1-K67M kofunktioniert. Allerdings wird diese PM, genauso wie CDC25C-wt von Pim-1-wt phosphoryliert. Dementsprechend sagt die Immunfluoreszenz zwischen CDC25C und Pim-1 nichts über die Interaktion aus. Während der Interphase pendelt CDC25C zwischen Cytoplasma und Zellkern hin und her, wobei der Export überwiegt. Durch Pim-1-wt-Bindung in der Region 180-211 könnte die NES-Sequenz (190-199) verdeckt und die NLS-Sequenz (240-244) noch frei zugänglich sein, so dass CDC25C letztendlich durch Inhibierung des Kern-Exports im Zellkern akkumuliert. Möglicherweise kann Pim-1-wt nach Phosphorylierung einer AS in der NES-Sequenz (Ser191 oder 198) auch wieder abdiffundieren, wodurch die Inhibierung des Exportes durch die Phosphorylierung verursacht werden könnte. Es ist bekannt, dass die Kinase Plk1 CDC25C u.a. am Ser198 der NES-Sequenz phosphoryliert. Das Exportprotein Crm1 kann dadurch

CDC25C nicht mehr binden und exportieren. Aktives CDC25C akkumuliert im Kern und kann dort seine Aktivität entfalten (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002). Gleiches trifft jedoch nicht auf die inaktive Pim-1-K67M-Mutante zu. Diese kann mit CDC25C interagieren, liegt aber weder mit CDC25C kolokalisiert vor noch ist die Mutante fähig, CDC25C zu phosphorylieren.

Von einer Akkumulation im Zellkern würde der Cyclin B1/cdk1-Komplex profitieren, der ebenfalls zwischen Zellkern und Cytoplasma hin und her transportiert wird und letztendlich über Dephosphorylierung durch CDC25C aktiviert wird. Bisher ungeklärt ist auch die Tatsache, ob Cyclin B1/cdk1 im Zellkern oder im Cytoplasma aktiviert wird, bzw. bei welchen Aktivierungsstatus die Akkumulation im Zellkern erfolgt. Die Centrosomen-Separation und die Umlagerung des Golgi-Apparates sprechen für eine Aktivierung im Cytoplasma. Die Lokalisation unterschiedlicher aktivierter Proteine wäre ein weiterer Mechanismus, um geringere Aktivitäts-Schwankungen verschiedener Proteine auszugleichen, um z.B. einen verfrühten Mitose-Beginn zu vermeiden. Die Lokalisation wäre in dieser Hinsicht eine Kontrollfunktion, da unterschiedliche Proteine eine gleiche Lokalisation in ausreichender Menge aufweisen müssen. Der koordinierte Import von CDC25C und Cyclin B1 könnte den cdk1-Aktivierungs-Prozess erhöhen.

Die inhibitorische Kinase Wee1 ist während der Interphase im Zellkern lokalisiert und wird erst zu Beginn der Prophase im größeren Maße exportiert. Demzufolge ist Wee1 in der Lage, das während der Interphase ebenso im Zellkern befindliche cdk1 zu inaktivieren ohne dadurch dessen Export zu beeinflussen. Eine weitere inhibitorische Kinase, Myt1, ist während des gesamten Zellzyklus im Cytoplasma lokalisiert (Mueller *et al.*, 1995). Transloziert der Cyclin B1/cdk1-Komplex am Anfang der Prophase in den Kern, entzieht sich der Komplex sowohl der Inaktivierung durch Myt1 als auch durch Wee1. Zusätzlich wird noch vorhandenes Wee1-Protein im Zellkern durch den aktivierten Cyclin B1/cdk1-Komplex inaktiviert (Baldin und Ducommun, 1995). Somit ist cdk1 im begrenztem Maße in der Lage, sich selbst zu aktivieren bzw. den Inhibitor zu inhibieren. Gleiches könnte für C-TAK1 und CDC25C gelten. Würde C-TAK1 in irgendeiner Weise durch Pim-1 daran gehindert werden, den Zellkern zu verlassen, könnte das cytoplasmatisch lokalisierte CDC25C-Protein aktiviert werden und in den Zellkern translozieren. Möglicherweise ist C-TAK1 im Zellkern nicht in der Lage, seine Funktion als inhibitorische Kinase von CDC25C auszuüben. Durch die aktivierenden Phosphorylierungen an der Phosphatase CDC25C, könnte eine Konformationsänderung des Proteins den Zugang zu der AS Ser216 verhindern bzw. erschweren, während zusätzlich die C-TAK1-Kinase-Aktivität durch Pim-1-Phosphorylierung herabgesetzt ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass C-TAK1 durch Phosphorylierung an der Translokation in den Zellkern gehindert wird, und sich CDC25C so dem inhibierenden Effekt durch C-TAK1 entzieht. Die

Möglichkeit erscheint unwahrscheinlich, da die Daten aus den Kotransfektions-Experimenten nahe legen, dass Pim-1 für die nukleäre C-TAK1-Lokalisation verantwortlich ist.

Unklar ist allerdings bisher, welche Phosphatase für die Dephosphorylierung des Ser216 von CDC25C verantwortlich ist, welches Grundvoraussetzung für eine aktive CDC25C-Phosphatase ist.

3.4. Verknüpfung des G₂/M-Kontrollpunktes mit externen Stimuli

Es ist bekannt, dass C-TAK1 KSR1 (**K**inase **S**uppressor of **R**as 1) unter Änderung der Proteinkonformation phosphoryliert (Muller *et al.*, 2001). Diese Phosphorylierung führt zur Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen, welche KSR1 inaktivieren. Die C-TAK1/KSR1-Interaktion bleibt, im Gegensatz zur CDC25C/C-TAK1-Interaktion, konstitutiv bestehen. Der Einfluss von Wachstumsstimuli auf KSR1 führt zu einer aktivierenden Dephosphorylierung durch einen unbekannten Mechanismus, welches zur Translokation an die Plasmamembran, Kolokalisation mit MEK, dem stromaufwärts aktivierenden Protein Raf-1 und der stromabwärts gelegenen Kinase MAPK (engl.: **m**itogen **a**ctivated **p**rotein **k**inase) führt. Die Initiierung des MAPK-Signalweges erfolgt ursprünglich über das Ras-Protein, welches durch GTP-Bindung die Rekrutierung von Raf-1 an die Plasmamembran und die Aktivierung verschiedener MEK1/2 und ERK-Kinasen (MAP-Kinasen) bewirkt. Durch den Ras-Signalweg wird die Expression von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren beeinflusst, z.B. von c-Fos (Canman und Kastan, 1996; Garrington und Johnson, 1999,). Der Transkriptionsfaktor c-Jun wird über den Rac/Rho-Signalweg aktiviert. c-Jun bildet mit c-Fos den Transkriptionsfaktor AP-1 (Schuermann *et al.*, 1989). Dieser ist in der Lage mit NFAT und NFκB weitere Gene der Differenzierung und Proliferation zu regulieren. Im Falle von T-Zellen tritt dieser Mechanismus nach Antigen-Stimulierung ein. NFκB besitzt wiederum einen Einfluss auf STAT5. *Pim-1* ist ebenfalls ein stromabwärts gelegenes Zielgen für diverse Zytokine und letztendlich durch STAT-Proteine aktivierbar (Abb.1.5). Die Aktivität von NFAT wird durch Pim-1 erhöht, so dass auch hier ein positiver Rückkopplungs-Mechanismus vorhanden ist (Rainio *et al.*, 2002).

Da Pim-1 in der Lage ist, die C-TAK1-Kinase-Aktivität in Bezug auf CDC25C zu erniedrigen, wäre es interessant zu untersuchen, ob durch Pim-1-Phosphorylierung die C-TAK1-Kinase-Aktivität in Bezug auf KSR1 ebenfalls herabgesetzt ist. Es wäre ein Mechanismus denkbar, dass Pim-1 über KSR1 den Ras-Signalweg aktiviert und dadurch letztendlich seine eigene Expression erhöht. Andererseits wäre auch eine Möglichkeit denkbar, bei der Pim-1 KSR1 zusätzlich direkt phosphorylieren und dadurch aktivieren könnte. Ein beschleunigter Effekt auf die Zellproliferation wurde in der DN3-Subpopulation der

Thymozyten-Entwicklung gezeigt (Leduc *et al.*, 2000; Shirogane *et al.*, 1999). Zum einem wäre durch die C-TAK1-Inaktivierung der Ras-Signalweg konstitutiv aktiv (vergleichbar mit konstitutiv aktiven Ras) und zum anderen wird der Effekt auf die Zellzyklusprogression verstärkt, weil C-TAK1 nicht mehr in der Lage ist, CDC25C am G₂/M-Kontrollpunkt zu inaktivieren. Neben dieser indirekten Aktivierung von CDC25C ist ein zusätzlicher Punkt die direkte Aktivierung von CDC25C durch Pim-1.

3.5. Hypothetische Rolle der Pim-1-Kinase am G₂/M-Kontrollpunkt

Abbildung 3.1 zeigt eine vereinfachte/modifizierte Darstellung des G₂/M-Kontrollpunkt-Modells. Es kann aber weder die Lokalisation noch die genauen Aktivierungsschritte von Cyclin B1/cdk1 beschreiben. Ein entscheidender Punkt ist die Phosphorylierung von C-TAK1 durch die Kinase Pim-1 und die daraus eventuell resultierende Inaktivierung. Damit wäre C-TAK1 nicht mehr in der Lage, CDC25C an der AS Ser216 zu phosphorylieren und zu inaktivieren. CDC25C wird durch Interaktion mit PCNA (engl.: **p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen) zusätzlich im Cytoplasma zurückgehalten. PCNA ist ein Hilfsprotein für die Polymerase- σ und ist essentiell für die Replikation bzw. Reparatur der DNA. Das Proteinlevel steigt bis zum Ende der G₂-Phase an. Dieses wäre eine Verbindung zwischen Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle (Kawabe *et al.*, 2002). PCNA selbst wird wohl über eine posttranslationale Modifikation reguliert (Hoege *et al.*, 2002). D.h., CDC25C wird durch C-TAK1 an der AS Ser216 phosphoryliert und anschließend durch Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen (Peng *et al.*, 1998) und zusätzlich durch die Interaktion mit PCNA inaktiviert (Kawabe *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen CDC25C und PCNA bleibt nur bis zu dem Beginn der Prophase bestehen. CDC25C braucht eine N-terminale Hyperphosphorylierung, welches u.a. durch die Kinase Plk1 erreicht wird. Es ist auch ein rückwirkender Mechanismus von Cyclin-B1/cdk1 auf CDC25C bekannt (Abrieu *et al.*, 1998; Cogswell *et al.*, 2000; Hagting *et al.*, 1999; Kumagai und Dunphy, 1996 und 1999; Li *et al.*, 1997; Pines und Hunter, 1994; Qian *et al.*, 2001; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1998). Die Interaktions-Domäne von PCNA wird von den AS 1-40 im N-terminalen Bereich begrenzt. In dieser Region sind 14 potentielle Serin/Threonin-Reste lokalisiert, die zur Aktivierung phosphoryliert werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der C-TAK1-Inaktivierung auch die aktivierende CDC25C-Phosphorylierung gezeigt. Pim-1 ist die 3. Kinase (neben Plk1 und Cyclin B1/cdk1), die die Fähigkeit besitzt, CDC25C zu phosphorylieren. Von großer Bedeutung ist, dass Pim-1-wt schon allein in der Lage ist, die Phosphatase-Aktivität von CDC25C zu erhöhen. Es

Stimuli

KSR1

Ras-Signalweg

inaktiv C-TAK1^P

aktiv C-TAK1

Pim-1

Plk1

CDC25C Ser216

14-3-3

Chk1

Cds1

PCNA

PP2A

CDC25C

CDC25C^P

aktiv CDC25C

Dephosph.

MPF

Cyclin B1

cdk1

G2

M

Cytoplasmatische und nukleäre Ereignisse

Pim-1 ist in der Lage, die Kinase C-TAK1 durch Phosphorylierung zu inaktivieren und die CDC25C-Phosphatase somit indirekt zu aktivieren. Pim-1 aktiviert durch Phosphorylierung ebenfalls direkt CDC25C. Durch eine zusätzliche Phosphorylierung von Plk1 und die Rückkopplungs-Phosphorylierung der Cyclin B1/cdk1-Kinase wird CDC25C N-terminal hyperphosphoryliert und aktiviert. Die Dephosphorylierung von Cyclin B1/cdk1 ist der erste aktivierende Schritt für diesen Komplex um letztendlich M-Phase-Gene zu aktivieren. Durch Inaktivierung von C-TAK1 ist die Inhibierung von KSR1 nicht mehr gewährleistet, so dass eventuell ein auf Pim-1 zurückführender Rückkopplungseffekt über den Ras-Signalweg vorliegen könnte. MPF, engl.: **m**aturation **p**romoting factor, ???: bisher unbekannte Mechanismen.

Ein anderer, noch ungeklärter Aspekt, ist die Überlegung, ob der Cyclin B1/cdk1-Komplex ebenfalls von Pim-1 aktivierend phosphoryliert werden kann. Diese Phosphorylierung ist vom Aktivierungsablauf nur sinnvoll, wenn der Cyclin B1/cdk1-Komplex zuvor durch die aktivierte CDC25C-Phosphatase dephosphoryliert wurde.

Weiterhin stellt sich die Frage nach einem Mechanismus zur Pim-1-Regulierung. Während das *Pim-1*-Gen Ziel der STAT-Proteine ist, die über Signalkaskaden aktiviert werden (Abb. 1.5), soll Hsp90 für die Stabilität des Pim-1-Proteins verantwortlich sein (Mizuno *et al.*, 2001). Im Verlauf der Arbeit wurde eine weitere Interaktion zwischen Pim-1 und Pias3 entdeckt (Abb. 2.9 und 2.10). Pias-Proteine wurden ursprünglich als Inhibitoren von aktivierten STAT-Proteinen isoliert (engl.: **p**rotein **I**nhibitor of **a**ctivated **S**TAT). STAT3 wird z.B durch Pias3 inhibiert. Die Interaktion von sowohl Pias3/Pim-1 als auch Pias1/Pim-1 wurde in verschiedenen Experimenten nachgewiesen. Allerdings kommt es zu keiner Phosphorylierung der Pias-Proteine durch Pim-1. Es ist bekannt, dass Pias3 durch den Transkriptionsfaktor Gfi-1 inhibierend reguliert wird. Somit ist Gfi-1 indirekt für eine Pim-1-Aktivierung verantwortlich (Rödel *et al.*, 2000). Der Pias1/3-Pim-1 Interaktion kam mehr Bedeutung zu, als entdeckt wurde, dass Pias1 die E3-Ligase für eine posttranslationale Modifikation des Tumorsuppressorproteins p53 ist. Bei dieser Modifikation handelt es sich um eine Sumoylierung. Dieser Mechanismus ist der Ubiquitinierung ähnlich, allerdings mit dem Unterschied, dass unterschiedliche Enzyme genutzt werden und dass es sich bei dem kovalent an das Ziel-Protein gebundenen Monomer/Multimer um SUMO-1 (engl.: **s**mall **u**biquitin like **m**odifier) handelt. Nachfolgend wurden noch weitere Zielproteine des SUMO-Signalweges entdeckt (Hoegge *et al.*, 2002; Jackson, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Sachdev *et al.*, 2001; Schmidt und Muller, 2002). Die resultierenden Effekte können eine Aktivierung von Inhibitoren, die Inhibierung von Aktivatoren, die Translokation von Proteinen oder die Speicherung von Proteinen in subzelluläre Partikel sein. Es ist noch nicht gezeigt, dass Pias3 als eine E3-Ligase fungiert. Ein denkbarer Mechanismus wäre, dass Pim-1 durch eine E3-Ligase sumoyliert und in subzelluläre Partikel gespeichert werden könnte. Die Pim-1-Aktivität könnte mit Hilfe einer geregelten Freisetzung aus diesen erfolgen. Möglicherweise könnte Pim-1 auch direkt aktiviert bzw. reprimiert werden.

4. Zusammenfassung

Mittels eines neuartigen Hefe-Interaktions-Systems (engl.: **Ras-Recruitment-System**, RRS) wurde ein Protein isoliert, welches mit dem Proto-Onkogen Pim-1 interagiert. Dabei handelte es sich um die Serin/Threonin-Kinase C-TAK1 (**CDC twenty-five associated Kinase 1**). C-TAK1 phosphoryliert die Phosphatase CDC25C an der AS Ser216, wodurch diese durch Rekrutierung von 14-3-3-Adapter-Proteinen inaktiviert wird. Pim-1 war ebenfalls in der Lage, im herkömmlichen Hefe-System (engl.: Yeast two hybrid) mit C-TAK1 zu interagieren. Das RRS-System wurde weiterhin zur Erzeugung einer nicht-interagierenden Punktmutante (C-TAK1-L128P) genutzt. Neben dem schon bekannten C-TAK1-wt-Protein konnten zusätzlich noch zwei weitere humane Spleiß-Varianten, C-TAK1- α und β , beschrieben werden.

Die Interaktion zwischen Pim-1 und C-TAK1 wurde in GST-Interaktions-Experimenten, Immunopräzipitationen und Immunfluoreszenzen bestätigt. Dies war unabhängig von der Verwendung des Pim-1-wt-Proteins oder der inaktiven Pim-1-K67M-Mutante. Die zwei C-TAK1-Spleiß-Varianten zeigten dabei keinen Unterschied zum isolierten C-TAK1-wt-Protein. Es konnte auch endogenes Pim-1-Protein mit C-TAK1 in einem Komplex nachgewiesen werden.

In den biochemischen Studien stellte sich heraus, dass Pim-1 nicht nur mit C-TAK1, sondern auch mit der Phosphatase CDC25C interagiert. Die Pim-1/CDC25C-Interaktion konnte ebenfalls in endogenen Komplexen nachgewiesen werden.

In Kinase-Experimenten stellte sich heraus, dass sowohl C-TAK1 als auch CDC25C von Pim-1-wt, aber nicht von der Pim-1-inaktiven Mutante, phosphoryliert wurden. Durch Deletions-Mutanten konnte nicht nur die Pim-1-Interaktions-Domäne in dem C-TAK1- und CDC25C-Protein, sondern ebenfalls mögliche Phosphorylierungs-Bereiche bestimmt werden. In den beiden NLS-Sequenzen im C-Terminus des C-TAK1-Proteins ist ein abgewandeltes und ein Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv enthalten. Allerdings liegen die Pim-1-Phosphorylierungs-Stellen in dem C-TAK1-Protein sowohl im N-Terminus als auch im C-Terminus. CDC25C wird an einem oder mehreren Serinen oder Threoninen durch Pim-1 phosphoryliert, nicht aber an der AS Ser216. CDC25C besitzt allerdings kein gegenwärtiges postuliertes Pim-1-Phosphorylierungs-Motiv.

In einem C-TAK1-Inaktivierungs-Experiment konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von C-TAK1 durch die Pim-1-Phosphorylierung herabgesetzt wird. Die Phosphatase-Aktivität von CDC25C im Phosphatase-Experiment wurde dagegen durch Pim-1-Phosphorylierung erhöht. Demzufolge übt Pim-1 sowohl eine indirekte (über C-TAK1) als auch eine direkte Aktivierung auf CDC25C aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pim-1-Kinase eine wichtige Rolle am G₂/M-Kontrollpunkt einnimmt und dass Pim-1 ein wichtiges Bindeglied zwischen Zytokin-/Wachstumssignalwegen und Proliferation darstellt.

5. Material und Methoden

Die nachfolgenden Arbeitsprotokolle sind den Methodensammlungen von Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) entnommen, wenn nicht auf andere Literaturquellen verwiesen ist.

5.1. Chemikalien, Enzyme, Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten, nicht radioaktiven Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Invitrogen, Merck Eurolab, Roche, Roth, New England Biolabs (NEB), Sigma und MWG bezogen. Alle radioaktiven Chemikalien wurden von der Fa. Amersham Pharmacia Biotech bezogen.

5.1.1. Häufig verwendete Lösungen:

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Prozentangaben bei Flüssigkeiten auf v/v und bei Feststoffen auf w/v.

Acrylamidlösung:	38 %	Acrylamid
	2 %	N,N'-Methylenbisacrylamid
Ethidiumbromidlsg.:	10 mg/ml	Ethidiumbromid in TE
5x DNA-Probenpuffer:	20 %	Ficoll 400
	0,025 %	Bromphenolblau
	0,025 %	Xylencyanol
	100 mM	EDTA (pH 8,0)
4x SDS-Probenpuffer:	62 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 %	SDS
	10 %	Glycerol
	100 mM	DTT
	5 %	β-Mercaptoethanol
	0,025 %	Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	32 g/l	Tris
	186 g/l	Glycerol
TAE:	40 mM	Tris-Acetat, pH 7,8
	2 mM	EDTA (pH 8,0)
TE:	10 mM	Tris-HCl, pH unterschiedlich: von 7,5-8,0
	1 mM	EDTA
PBS:	137 mM	NaCl
	2,6 mM	KCl
	6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,3 einstellen

5.1.2. Verwendete Größenmarker

DNA-Größenmarker	1 kb DNA-Leitermarker; Fa. Genecraft
Protein-Größenmarker	Vorgefärbter SDS-PAGE Standard (Broad Range), Fa. NEB
¹⁴ C-Protein-Größenmarker	¹⁴ C methylierte Proteine; Amersham

5.2. Arbeiten mit DNA

5.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1986)

Zur Erzeugung von definierten DNA-Fragmenten zwecks Klonierung wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Der 50 µl Ansatz enthielt 0,5 µg Plasmid, je 50 pmol eines 5' und eines 3' Oligodesoxynukleotids (Primer), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 5 µl 10x PCR-Puffer und 1 U Vent-Polymerase (NEB). Der Ansatz wurde für 2 min. auf 95 °C erhitzt.

PCR-Programm:	22-30 Zyklen
Denaturierung	20 Sekunden 95 °C
Primer-Anlagerung	20 Sekunden 50-60 °C (je nach Primer)
Polymerase-Reaktion	60 Sekunden 72 °C (ca. 1 min. /1000 nt Produkt)

Nach dem letzten Zyklus wurde der Reaktionsansatz für 5 min. bei 72 °C inkubiert. Je 5 µl eines Ansatzes wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Alle durch PCR amplifizierten DNA-Konstrukte wurden im Anschluss sequenziert.

Weiterhin wurde die PCR zu Detektierungszwecken von Plasmiden im Hefesystem angewandt (Taq-Polymerase). Als Ausgangsmaterial dienten dabei Hefe-Kolonien.

5.2.1.1. Herstellung von Punktmutanten (PM)

Die Herstellung von Punktmutanten (PM) erfolgte mittels PCR. In der ersten PCR wurde ein definiertes PCR-Fragment hergestellt. Dabei trug ein Primer die PM, der zweite eine bekannte Restriktionsendonuklease-Schnittstelle. Die PCR-Fragmente wurden in 30 µl eluiert (5.2.5). Die Hälfte wurde in einer anschließender PCR als Mega-Primer verwendet. Der zweite Primer trug wiederum eine bekannte Restriktionsendonuklease-Schnittstelle. Das PCR-Fragment, welches intern die Mutation enthielt, wurde nach herkömmlichen Methoden verdaut, aufgereinigt und in der Ligation eingesetzt.

5.2.2. Restriktionsendonukleaseverdau

Zu analytischen Zwecken wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in 15 µl Gesamtvolumen für 1 h bei 37 °C verdaut. Für präparative Zwecke wurden 5 µg Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz 2 h verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab des Verdaus angepasst, war jedoch nie größer als 10 % des Gesamtvolumens. Somit wurde sichergestellt, dass die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wurde.

5.2.3. Konversion überhängender DNA-Enden

Da es in einigen Fällen nicht möglich war, den Vektor und das DNA-Fragment (engl.: Insert) mit komplementären, überhängenden Enden zu generieren, mussten Enden ohne Überhang erzeugt werden. Dabei wurden 5' Überhänge durch eine Auffüllreaktion, 3' Überhänge durch eine Abbaureaktion konvertiert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA nach dem Restriktionsendonukleaseverdau aufgereinigt und in 86 µl bidest Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl T4-DNA-Polymerase-Puffer, 1 µl BSA (5 mg/ml), 2 µl T4-DNA-Polymerase (3 U/µl, NEB) und im Falle der Auffüllreaktion 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min. bei 12 °C und dann für 10 min. bei 70 °C inkubiert, aufgereinigt und anschließend zur Ligation eingesetzt.

5.2.4. Dephosphorylierung von 5' Enden der DNA

Um eine Religation des Vektors und damit den nichtrekombinanten Hintergrund zu verringern, wurde der zur Religation notwendige 5' Phosphatrest des Vektors hydrolytisch abgespalten. Dazu wurde der Restriktionsansatz 10 min. vor Beendigung des Verdaus mit 0,5 µl Alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (CIP, 10 U/µl, NEB) versetzt. Im Anschluss daran wurde die Vektor-DNA vom Enzym mit Hilfe eines Qiaquick PCR Purification Kits (Fa. Qiagen) aufgereinigt.

5.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus Agarosegelen ausgeschnitten. Zur Aufreinigung aus dem Gel wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen wurde der PCR-Purification Kit der Fa. Qiagen verwendet.

5.2.6. Ligation

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 20-50 ng Vektor-DNA mit drei Äquivalenten DNA-Fragment versetzt. Der Ansatz wurde in Gegenwart von 0,5 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl, Fa. Takara) 1-2 h bei RT inkubiert.

5.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Endonukleaseverdaute DNA oder PCR-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-2,0 %-ige Gele verwendet, die zur Visualisierung der DNA 0,01 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die DNA-Proben wurden mit 4x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 100-160 V in 1x TAE als Laufpuffer. Mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids konnte die DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm sichtbar gemacht werden.

5.2.8. Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präp)

Die durch eine Einzelkolonie (E.coli Stamm DH5α oder REP4) in LB-Medium (+ Ampicillin oder Kanamycin oder beides) angeimpften Übernachtskulturen (37 °C) wurden sedimentiert (1 min., 6000 rpm). Das Pellet wurde in 150 µl P1 resuspendiert und nach Zugabe von 150 µl P2 lysiert. Versetzen mit 150 µl P3 führte zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe. Nach Zentrifugation (5 min., 13000 rpm) wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit Isopropanol versetzt (7/10 des Volumen), und das DNA-Präzipitat sedimentiert (12 min., 13000 rpm). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen. Über Restriktionsendonukleaseverdau und gelelektrophoretische Auftrennung wurden die positiven Klone identifiziert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen diente eine 1kB-Leiter (Fa. GeneCraft).

Puffer P1:	10 mM	EDTA
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100 µg/ml	RNaseA
Puffer P2:	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat
		mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen

5.2.9. Präparative Plasmid-Isolierung (Qiagen-System)

Zur Gewinnung von aufgereinigter DNA in größeren Mengen wurde der Plasmid Maxi Kit der Fa. Qiagen verwendet. 150 ml Bakteriensuspension wurden sedimentiert und nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde in TE resuspendiert.

5.2.10. Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Dazu wurden die Nukleinsäuren in der Regel 1:100 in bidest Wasser oder TE verdünnt. Dabei entsprachen:

- 1 OD₂₆₀ = 50 µg /ml für doppelsträngige DNA
- 1 OD₂₆₀ = 40 µg /ml für einzelsträngige DNA oder RNA

5.2.11. Sequenzierung von DNA

Die DNA Proben zum Sequenzieren wurden in einer Konzentration von 200 ng/µl im Falle von Plasmiden und 50 ng/µl im Falle von PCR-Fragmenten zu einem Sequenzierservice gegeben. Die Primer-Konzentration betrug 5 pmol/µl (bzw. 10 pmol/µl).

5.3. Bakterien

5.3.1. Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5α	F', endA1, hsdR17, (r _k ⁻ m _k ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal ^r), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, (φ80dlacD(lacZ)M15)
<i>E.coli</i> M15 (pREP4):	F, Nal ^s , Str ^s , Rif ^s , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺

5.3.2. Bakterienmedien

LB-Medium:	1 % NaCl
	1 % Casein-Hydrolysat
	0,5 % Hefe-Extrakt
	pH 7,2 mit NaOH einstellen
LB-Agar:	15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium
Ampicillin:	80 mg/ml Endkonzentration 80 µg/ml

Kanamycin:	25 mg/ml	Endkonzentration 25 µg/ml
SOB	20 % 5 % 9 mM 2,5 mM	Trypton Yeast-Extrakt NaCl KCl ad 1000 ml bidest Wasser, pH 7,0 (NaOH), autoklavieren; vor Gebrauch: Zugabe von 5 ml 2 M MgCl ₂ (10 mM)
SOC	20 mM	SOB α-D-Glukose

5.3.3. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden nach der CaCl₂-Methode hergestellt, aliquotiert und für den späteren Gebrauch eingefroren. Eine 250 ml SOB-Kultur wurde mit Kolonien von einer LB-Platte angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 bei 20 °C wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien 10 min. auf Eis inkubiert, bei 4 °C pelletiert (3.000 rpm, 5 min.) und in 80 ml eisgekühlter TB-Puffer-Lösung resuspendiert.

TB-Puffer:	10 mM	Pipes
	15 mM	CaCl ₂
	0,25 M	KCl
		ad 100 ml bidest Wasser, pH 6,8 (NaOH) autoklavieren; vor Gebrauch: Zugabe von 55 mM MgCl ₂ (steril filtriert)

Nach einer Inkubation von 20 min. auf Eis wurden die Bakterien bei 4 °C pelletiert (3.000 rpm, 10 min) und in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von Glycerol (Endkonzentration 7 %) wurden die Bakterien aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

5.3.4. Herstellung elektrokompeter Bakterien

Elektrokompeter DH5α-Bakterien wurden nach der salzfreien Methode hergestellt. Dazu wurden 1000 ml YENB-Medium mit 5-10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,6 (logarithmische Wachstumsphase) wurden die Bakterien 20 min. auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min. sedimentiert (4 °C, 4000 rpm). Die Bakterienpellets wurden nach 2-maligem Waschen mit 100 ml kaltem sterilen bidest Wasser in 20 ml 10 % Glycerol resuspendiert und 10 min. auf Eis inkubiert. Diese wurden wieder abzentrifugiert und in 2-3 ml eiskaltem 10 % Glycerol resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

YENB:	0,75 %	Bacto Yeast Extrakt
	0,8 %	Bacto nutrient Broth

5.3.5. Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1-10 ng Plasmid-DNA wurden mit 100 µl einer auf Eis aufgetauten Suspension kompetenter Bakterien gemischt und 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 90 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 1 Stunde bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Entsprechend des Selektionsmarkers des Plasmids wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.4. Hefen

5.4.1. Hefestämme

Es wurden ausschließlich nur Hefestämme vom Typ *S. cerevisiae* verwendet .

CDC25-2: MATa, ura3, lys2, leu2, trp1, his 200, ade 101, cdc25-2, GAL+.

L40: MAT a, his3D200, trp1-901, leu2-3,112, ade2
 LYS::(lexAop)4-HIS3, URA::(lexAop)8-LacZ, gal4

5.4.2. Hefemedien

5.4.2.1. Vollmedien

YPAD:	10 g/l	Hefe-Extrakt
	20 g/l	Pepton
	20 g/l	α-D-Glukose
	10 ml	L-Adeninlösung (500 mg/100 ml)
		ad 1000 ml bidest Wasser
bei Platten:	24 g/l	Bacto-Agar (Fa. Difco) autoklavieren

5.4.2.2. Mangelmedien

SD-Medium	20 g/l	α-D-Glukose
	1,7 g/l	Yeast nitrogen base (Fa. Difco)
	5 g/l	Ammoniumsulfat
		ad 1000 ml bidest Wasser
	10 ml/l	pro Aminosäure (je nachdem - ura, -leu, -trp, - his, - met, -ade, -lys/ Stamm-Lsg.: 5 mg/ml)
bei Platten :	30 g/l	Bacto-agar (Fa. Difco) autoklavieren

SG-Medium:	30 g/l	D-Galaktose
	20 g/l	α -D-Raffinose
	1,7 g/l	Yeast nitrogen base (Fa. Difco)
	5 g/l	Ammoniumsulfat
	23 g/l	Glycerol (87%)
	10 ml/l	pro Aminosäure (je nachdem - ura, -leu, -trp, - his, - met, -ade, -lys/ Stamm-Lsg.: 5 mg/ml)
bei Platten:	30 g/l	Bacto-Agar (Fa. Difco) ad 1000 ml bidest Wasser autoklavieren
SR-Medium:	30 g/l	α -D-Raffinose
	1,7 g/l	Yeast nitrogen base (Fa. Difco)
	5 g/l	Ammoniumsulfat
	10 ml/l	pro Aminosäure (je nachdem - ura, -leu, -trp, - his, - met, -ade, -lys/ Stamm-Lsg.: 5 mg/ml)
bei Platten:	30 g/l	Bacto-Agar (Fa. Difco) ad 1000 ml bidest Wasser autoklavieren

Bei Verwendung des L40-Hefe-Stammes wurden 20 ml Aminosäuren-Mix pro Liter Mangelmedium zugegeben.

Aminosäuren-Mix: (400 ml)	10 ml	L-Arginin (HCl), 0,24 g/100 ml
	50 ml	L-Aspartat, 1,2 g/100 ml
	50 ml	L-Glutamat, 1,2 g/100 ml
	20 ml	L-Isoleucin, 0,24 g/100 ml
	25 ml	L-Phenylalanin, 0,6 g/100 ml
	25 ml	L-Serin, 4,500 g/100 ml
	25 ml	L-Threonin, 2,4 g/100 ml
	100 ml	L-Tyrosin, 0,18 g/100 ml
	25 ml	L-Valin, 1,8 g/100 ml
	10 ml	L-Methionin, 0,24 g/100 ml
		(nicht bei Plasmiden mit MET 25 Promotor) ad 400 ml bidest Wasser und durch 0,2 μ m Filter sterilfiltriert

5.4.3. Transformation von Hefezellen

Hefezellen wurden mit der Lithium-Acetat-Methode chemisch transformiert. Dabei wurde eine Übernachtvorkultur in 2x 200 ml YPD oder YPAD (YPD + L-Adeninlösung) verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei einer entsprechenden Temperatur wachsen gelassen (CDC25-2: 25 °C, L40: 30 °C). Die Hefen wurden pelletiert (2.000 rpm, 5 min.), einmal mit sterilem bidest Wasser (1/5 des Volumens) und einmal mit LISORB (1/10 des Volumens) gewaschen und anschließend in LISORB aufgenommen (50 μ l/ Interaktions-Experiment-Transformation; bei allen anderen Retransformationen wurde jeweils immer nur die Hälfte der angegebenen Volumina verwendet). Für 10 Transformationen wurden 100 μ l Carrier-DNA (Lachs Sperma DNA; engl.: Salmon sperm testis, 20 mg/ml) für 3-5 min. bei 95 °C denaturiert, mit 400 μ l LISORB versetzt und auf Eis gekühlt. Zu der vorgegebenen Plasmid-DNA (2-3 μ g) wurden 50 μ l Carrier-DNA-Mix und 50 μ l kompetente Hefe-Zellen gegeben und 30 min. bei RT

inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl LIPEG wurden diese wieder für 30 min. bei RT und nach anschließender Zugabe von 100 µl DMSO 10 min. bei 42 °C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Hefen sedimentiert (2.000 rpm, 5 min.), in 200 µl bidest Wasser aufgenommen, auf den entsprechenden Platten ausgestrichen und 4-5 Tage bei 30 °C (Hefe-Stamm L40) oder 25 °C (Hefe-Stamm CDC25-2) im Wärmeschrank zum Hochwachsen der Hefekolonien inkubiert.

LISORB:	100 mM	Lithium-Acetat (Stock: 1M)
	1 M	Sorbitol (Stock: 2M) in TE (pH 7,5) durch 0,2 µm Filter sterilfiltriert
LIPEG:	100 mM	Lithium-Acetat (Stock: 1M)
	40 %	PEG 3350 (Stock: 50 %) in TE (pH 7,5)/ autoklaviert

5.4.4. Ras-Recruitment-System (RRS, Broder et al., 1998)

Als "Köder"-Protein wurde eine Pim-1 inaktive Mutante, Pim-1-K67M, verwendet. Das Ras-Pim-1-K67M-Fusionsprotein (Marker: LEU2) und das GAP-Plasmid (Marker: TRP1) wurden in den Hefe-Stamm CDC25-2 transformiert und auf deren Protein-Expression hin untersucht. Dieser "Köder"-Hefe-Stamm wurde mit der GC1-B1-6 Hypophysen-Bibliothek der Ratte transformiert (Marker: URA3), auf Selektiv-Glukose-Platten (SD -ura-trp-leu; Ø 15 cm; 30 Schalen) ausplattiert und 4-5 Tage bei 25 °C inkubiert. Die SD-Platten wurden anschließend auf Galaktose-Platten (SG-ura-trp-leu) replika-plattiert und 5 Tage bei 36 °C inkubiert. Die angewachsenen positiven Klone wurden gepickt und auf Selektiv-SD-Platten (-ura-trp-leu; Ø 10 cm) etabliert (25 °C). Nach Hochwachsen dieser Klone wurden diese auf Selektiv-SG und SD-Platten (-ura-trp-leu; Ø 10 cm) replika-plattiert und bei 36 °C inkubiert. Mit den noch positiven Klonen wurde eine "SOS"-PCR durchgeführt (Primer: SOSs und SOSas), um die "falsch-positiven" zu eliminieren. Die weiterhin positiven Klone wurden von der SD-Platte (25 °C) in SD-Selektiv-Medium angeimpft (-ura-trp-leu), um einen Tag später die Hefe-DNA zu isolieren. Optional konnte die "SOS"-PCR auch auf der Hefe-DNA durchgeführt werden. Um das Bibliotheks-Plasmid zu identifizieren, wurden 2 µl Hefe-DNA mit einem Puls von 1,7 kV, 50 µF und einem Widerstand von 70-100 Ohm in elektrokompente Bakterien transformiert, in 900 µl SOC-Medium 1 h inkubiert und auf LB-Platten (inklusive Ampicillin) ausplattiert. Alle in Hefen verwendeten Vektoren waren auch in der Lage, sich in Bakterien zu replizieren. Sie alle kodierten für eine Ampicillin-Resistenz. Mit den angewachsenen Kolonien wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Zur Unterscheidung der verschiedenen Plasmide in den Bakterien wurden spezielle URA3-Primer für das Bibliotheks-Plasmid (Primer: Ura3a und Ura3b) und LEU2-Primer (Leu2a und Leu2b) verwendet. Die LEU2-Primer dienten zur Unterscheidung für das "Köder"-Pim-1-K67M und

GAP-Plasmid, da im GAP-Plasmid der TRP1-Marker in den LEU2-Marker inseriert ist, so dass diese beiden Plasmide unterschiedlich große PCR-Fragmente ergaben. Die positiven Bakterien-Kolonien wurden ü.N. in 3 ml LB-Medium angeimpft und nach dem Plasmid-Mini-Präparations-Protokoll behandelt. Das Bibliotheks-Plasmid wurde in einem letzten Schritt mit und ohne dem "Köder"-Plasmid (ohne GAP-Plasmid) für den Spezifitäts-Test in den Hefestamm zurück transformiert und auf Selektiv-SD-Platten (-ura-leu; Ø 10 cm) bei 25 °C inkubiert. Sobald die Hefe-Kolonien hochgewachsen waren, wurden diese erneut auf Selektiv-SG- und SD-Platten replika-plattiert (-ura-leu; Ø 10 cm) und bei 36 °C inkubiert. Die Bibliotheks-Plasmide der dann noch positiven Klone wurden sequenziert (Sequenzier-Service, Uni-Klinikum).

5.4.5. Herstellung einer nicht-interagierenden Punktmutante in Hefe

Die Herstellung von Punktmutationen erfolgte mittels "Fehler-PCR". Dabei wurden zwei unabhängige PCRs inklusive 0,25 mM oder 0,5 mM $MnCl_2$ durchgeführt. Als Ausgangskonstrukt ist das isolierte Plasmid verwendet worden. Für die PCR wurden ein 5'- und ein 3'-Primer eingesetzt, die auf dem Plasmid YesMdpA binden (Primer SOSs und Yes2b3). Das PCR-Gemisch wurde mit dem linearisierten Bibliotheks-Plasmid YesMdpA (# *EcoRI*, *XhoI*) und dem "Köder"-Vektor in den Hefe-Stamm CDC25-2 transformiert und bei 25 °C auf Selektions-SD-Platten ein paar Tage inkubiert. Durch homologe Rekombination in Hefe ist es möglich, dass (mutierte)-PCR-Fragmente in den Bibliotheks-Vektor eingebaut werden, so dass letztendlich evtl. eine Punktmutation (PM) dabei ist, die nicht mehr mit dem "Köder" interagieren kann. Anschließend wurden die Platten auf Selektions-SG-Platten replika-plattiert und bei 36 °C inkubiert. In den Fällen der nicht-wachsenden Kolonien wurde von den Kolonien der Ausgangs-SD-Platte eine "Insertions-Fragment-PCR" durchgeführt. D.h., es sind Primer verwendet worden, die 5'- und 3'- des inserierten Fragments auf dem Bibliotheks-Plasmid binden (Primer: Myr4 und Yes2b3). Wenn ein inseriertes Fragment vorhanden war, ist dieses, nach Isolierung der Plasmid-DNA, sequenziert worden.

5.4.6. Gesamtproteinextraktion aus Hefen

Zur Gewinnung eines Proteinextraktes aus Hefen wurde eine 3 ml Mangel-Medium-Kultur angeimpft und bei Erreichen einer OD_{600} von 0,3 sedimentiert (3.000 rpm, 5 min.). Das Pellet wurde in 200 µl 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 4x bei -80 °C eingefroren und bei 37 °C aufgetaut. Nach Abzentrifugation der Festbestandteile (13.000 rpm, 5 min.) wurden aus dem Überstand 40 µl durch SDS-PAGE analysiert.

5.4.7. DNA-Präparation aus Hefe

Die Hefen wurden ü.N. in Selektiv-SD-Medium inkubiert und bei 6000 rpm, 1 min. bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 400 µl DB-Puffer (1 M Sorbitol, 1 mM EDTA) resuspendiert und mit 40 µl Zymolase (20 mg/ml) versetzt (1 h). Die sedimentierten Zellen (6000 rpm, 1 min.) wurden nach dem gebräuchlichen Plasmid-Mini-Präparations-Protokoll (5.2.8) behandelt und in TE-Puffer aufgenommen. Anschließend ist die Hefe-DNA durch den "QiaexII-gel-extraction-Kit" (Fa. Qiagen) nach den Herstellerangaben gereinigt worden.

5.4.8. Einfrieren und Auftauen von Hefezellen

Ein Hefeklon wurde ü.N. in 3 ml YPD, YPAD oder Minimal-Medium wachsen gelassen, sedimentiert und in 1 ml Einfriermedium (50 % YPD und 50 % Glycerol (autoklaviert)) resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h auf Eis inkubiert und dann bei -80 °C eingefroren. Durch Abkratzen einer kleinen Menge von der Oberfläche der gefrorenen Kultur und Ausstreichen auf einer entsprechenden Platte, konnten die Hefen wieder aufgetaut werden.

5.4.9. β -Galaktosidase-Experiment

Für das β -Galaktosidase-Experiment ist der Hefestamm L40 verwendet worden. Dieser ist mit dem LacZ-Gen transformiert. Der L40-Hefestamm ist auxotroph für Uracil und Lysin. Hefekulturen wurden nach der Transformation mit sterilen Zahnstochern auf entsprechenden SD-Platten etabliert (8 Klone pro Platte). Die Platten konnten bis zu 3 Monate bei 4 °C gelagert werden. Zur Induktion des Gal4-Promotors des VP16-Plasmids wurden die Hefen im 3 ml SR-Selektivmedium angeimpft und zwei Tage kultiviert. Danach wurden jeweils 100 µl der Kultur in 3 ml Selektivmedium/ 3 % Glukose zur Repression des Gal4-Promotors bzw. in 3 ml SRG-Selektivmedium/ 3 % Galaktose zur Induktion des Gal4-Promotors angeimpft. Zur Induktion des Met25-Promotors wurden die Hefen in Abwesenheit von Methionin in dem entsprechenden Selektivmedium kultiviert. In der Regel wurde diese Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 in einem Experiment eingesetzt. Die Hefen wurden sedimentiert und in 1,2 ml Z-Puffer resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 150 µl (= Volumen V_E) in Z-Puffer ad 1 ml verdünnt (in einem Eppendorfreaktionsgefäß); der Rest wurde zur Messung der Kulturdichte (OD₆₀₀) verwendet (100 µl Zell-Suspension und 900 µl H₂O). Nach Zugabe von 15 µl Chloroform und 10 µl einer 0,1 % SDS-Lösung wurden die Hefen durch vortexen (5 sek.) aufgeschlossen. Nach Äquilibrieren bei 30 °C und Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung (vorher bei 30 °C äquilibriert) wurde die Reaktion gestartet. Bei einer deutlich sichtbaren Gelbfärbung bzw. spätestens nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt (Messung der Reaktionsdauer t_R). Nach Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile (13.000 rpm, 10 min.) wurde bei jedem Reaktionsansatz die OD₄₂₀ bestimmt. Zur Kontrolle

des letzten Zentrifugationsschrittes wurde stichprobenartig bei einigen Ansätzen die OD_{550} bestimmt, welche in der Regel den Wert Null hatte. Zur Kalibrierung des Photometers wurde ein kompletter Blindansatz ohne Hefesuspension eingesetzt. Der Wert für die β -Galaktosidaseaktivität errechnete sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität (U)} = \frac{1000 \times OD_{420} (-1750 \times OD_{550})}{OD_{600} \times V_E \times t_R}$$

Z-Puffer:	60 mM	$NaH_2PO_4 \times 7 H_2O$
	40 mM	Na_2HPO_4
	10 mM	KCl
	1 mM	$MgSO_4 \times 7 H_2O$
	50 mM	β -Mercaptoethanol
		auf pH 7,0 einstellen
ONPG:	4 mg/ml	o-Nitrophenol Galaktose in 0,1 M KPO_4 , pH 7,0 sterilfiltriert und als Aliquots bei -20 °C gelagert
Lösungspuffer:	20 mM	HEPES, pH 7,9 (mit KOH einstellen)
	25 mM	Glycerol
	300 mM	NaCl
	2 mM	$MgCl_2$

Die Expression der Proteine wurde mittels Immunoblot nachgewiesen.

5.5. Zellkultur

5.5.1. Zelllinien

COS7:	Affennieren-Zelllinie, SV-40 transformiert (ATCC 1651, adhärent, DMEM)
NIH 3T3:	Maus-Fibroblasten Zelllinie (ATCC 1658, adhärent, DMEM)
Hela:	humane Zervixkarzinom-Epithel-Zelllinie (ATCC CCL2, adhärent, DMEM)
293	humane embryonale Nieren-Zelllinie (ATCC 1573, adhärent, DMEM)
U937:	humane histiozytische Lymphom-Zelllinie (ATCC 1593, Suspension, RPMI)
K562:	humane chronische myeloide Leukämie-Zelllinie (ATCC CRL243, Suspension, RPMI)

5.5.2. Zellkulturmedien

DMEM	Dulbeccos modified Eagle's Medium (pH 7,0)/ 4,5 g/l D-Glukose, 29,23 g/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO ₃
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, pH 7,0 mit 29,23 g/l L-Glutamin
FKS	Fötales Bovines Serum (Life Technologies); einmalig vor Gebrauch 30 min. bei 56 °C hitze-inaktivieren
Trypsin/ EDTA (VT):	2 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in PBS (pH 7,2) ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺
TPA	100 nM zur Stimulierung
Penicillin/ Streptomycin	6 g/l Penicillin(Fa. Grünenthal) 10000 (µg/ml) Streptomycin in 8,0 g/l NaCl 0,4 g/l KCl 1,0 g/l Glukose 0,35 g/l NaHCO ₃

5.5.3. Kultivierung der Zellen

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C unter Begasung mit 5 oder 7,5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung sterilisiert.

5.5.4. Passagieren von Zellen

Zum Passagieren wurde das Kulturmedium von den adhärent wachsenden Zelllinien vollständig abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die subkonfluenten Zell-Monolayer durch eine 5-minütige Inkubation mit VT abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde auf andere Zellkulturschalen (Nunc) verteilt. Weiterhin sind die Zellen zur Transfektion eingesetzt worden. Wenn für einige Experimente eine bestimmte Zelldichte benötigt wurde, ist diese mittels einer

Neubauer-Zählkammer ermittelt worden. Suspensions-Zellen sind durch Verdünnung passagiert worden.

5.5.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS vom Schalenboden mit VT abgelöst und 5 min. sedimentiert (1000 rpm). Das Pellet wurde in 500 µl Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem "Cryo Tub" (Nunc) gegeben und bei -80 °C eingefroren. Langfristig wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde ein "Cryo Tub" im Wasserbad (37 °C) erwärmt, bis der Inhalt komplett aufgetaut war. Die Zellen wurden in entsprechendem Medium aufgenommen und auf einer Zellkulturschale ausgesät.

Einfriermedium:	45 %	FKS
	45 %	DMEM
	10 %	DMSO

5.5.6. Transiente Transfektion von Zellen

Um rekombinante Proteine in Säugerzellen zu exprimieren, wurden Vektoren, die entsprechende cDNAs enthielten, in die Zellen transfiziert.

5.5.6.1. Elektroporation

Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Trypan-Blau-Ausschluß (0,2 % Trypanblau) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Alle Transfektionsansätze einer Versuchsreihe enthielten gleiche DNA-Mengen (bis zu 40 µg) und $1-3 \times 10^6$ Zellen in 200 µl DMEM-Medium (ohne FKS und Antibiotika). Die Zellen wurden in Elektroporationsküvetten (0,4 cm, Fa. Invitrogen) einem Puls von 230 V/cm und 500 µF (gilt für COS7-Zellen) oder 950 µF (gilt für NIH 3T3- und 293-Zellen) ausgesetzt und nach einer 5-minütigen Inkubation auf 6 oder 10 Ø cm Schalen (Fa. Nunc) überführt. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 oder 7,5 % CO₂ wurden die Zellen geerntet.

5.5.6.2. Calcium-Phosphat

Für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen für Immunfluoreszenzstudien (NIH 3T3-Zellen) wurde die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode verwendet. Für die Immunfluoreszenz wurde die Plasmid-DNA (2-8 µg) mit 6 µl 2 M CaCl₂ versetzt, in einem Gesamtvolumen von 50 µl sterilen bidest Wasser aufgenommen und nach 5 min. unter Verwirbeln tröpfchenweise zu 50 µl 2x HBS hinzugefügt. Der Niederschlag wurde auf die zuvor ausplattierten Zellen gegeben (12-well-Platten/ Nunc). Die Zellen wurden bei 37 °C und 3,5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 16 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit neuem Medium versetzt und bei 37 °C und 5 oder 7,5 % CO₂ für weitere 24 h inkubiert.

2x HBS:	50 mM	HEPES, pH 7,05
	280 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	12 mM	Glucose

5.5.7. Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzstudien wurden 30 000 NIH 3T3-Zellen pro well (12-well-Platte) auf runde Objektträgergläschen (Ø 15 mm) ausgesät und 5-8 h später mit bis zu 8 µg DNA mittels der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Zum Nachweis endogener Proteine wurden die Zellen nur ausgesät (Hela-Zellen). Die Zellen sind gegebenenfalls vor der Fixierung noch für eine bestimmte Zeit mit Zytokinen oder Wachstumsfaktoren stimuliert worden. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 10 min. mit Methanol fixiert. Suspensionszellen (K 562-Zellen) sind mit PBS gewaschen und in einem kleinen Volumen PBS auf vorher mit einem Fettstift markierte Objektträger aufgetropft und getrocknet worden. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. Im Anschluss daran wurden die fixierten Zellen 2x mit PBS gewaschen, 30 min. mit Immunfluoreszenz-Puffer äquilibriert und eine Stunde mit dem entsprechenden Primär-Antikörper inkubiert (α-Flag-M2-Antikörper (Sigma/ 4 mg/ml, 1:200), α-CDC25C (Biodiagnostics, BM-025C-100A, 1:200 (1,2 mg/ml) oder Santa Cruz, C-20, 1:200 (200 µg/ml)), α-C-TAK1 (eigene Herstellung, 1:100 (1 µg/µl)), α-Pim-1 (Santa Cruz, 19F7, 1:100, (200 µg/ml)), α-Gfi-1 (eigene Herstellung, 1:100) in 100 µl Immunfluoreszenz-Puffer). Nach 2-maligem Waschen mit Immunfluoreszenz-Puffer wurden die Zellen mit einem entsprechenden 2. Antikörper 60 min. inkubiert (FITC/TRITC-konjugiert Esel α-Maus/ Hase/ Ziege/ Schaf IgG (H+L) F(ab)₂-Fragment (Dianova), 1:200 in 100 µl Immunfluoreszenz-Puffer). Der Kern wurde je nach Bedarf mit Propidium-Iodid (1 mg/ml; 1:200) oder DAPI (200 µg/ml; 1:200) gefärbt (30 min., in 100 µl Immunfluoreszenz-Puffer). Die Zellen wurden mit dem Prolong Antifade Kit (Fa. Molecular probes) eingedeckelt. GFP-transfizierte Zellen wurden mit Methanol fixiert, mit PBS gewaschen, in Immunfluoreszenz-Puffer äquilibriert und in Prolong Antifade Kit eingedeckelt.

Immunfluoreszenz-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,05
	100 mM	NaCl
	0,05 %	Tween 20
	0,5 %	BSA (Fraktion V)

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen ist ein Laser-Scan-Mikroskop (LSM-Mikroskop, Fa. Carl-Zeiss) verwendet worden. Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit der dazugehörigen Software.

5.6. Proteine

5.6.1. Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Zur Herstellung von einem Ganzzell-Proteinextrakt wurden adhärent konfluent gewachsene oder transfizierte Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 5 ml eiskaltem PBS mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in ein 15 ml-Falcon überführt und sedimentiert (1.000 rpm, 5 min.). Das Pellet wurde in 50-400 µl Flag-Lysis-Puffer aufgenommen. Suspensions-Zellen wurden sedimentiert, mit PBS gewaschen und in Flag-Lysis-Puffer aufgenommen worden.

Flag-Lysis-Puffer:	25 mM	Tris-HCl, pH 7,4	
	150 mM	NaCl	
	1 mM	CaCl ₂	
	1 %	Triton-X-100	
	1:1000	DTT (1M)/	Proteinase-Inhibitoren (vor Gebrauch dazugeben)
Proteinase-Inhibitoren:	100 mg/ml	Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	
	1 mg/ml	Pepstatin	
	1 mg/ml	Bestatin	
		in 80 % Methanol und 20 % DMSO	
	1 mg/ml	Aprotenin	
	1 mg/ml	E64	
	1 M	Na ₃ VO ₄	
	1 M	Na ₂ MnO ₄	
		in bidest H ₂ O	

Nach Abzentrifugation aller unlöslichen Zellbestandteile wurde aus dem Überstand mit 2 µl eine Proteinbestimmung durchgeführt (Bradford-Reagenz). Für eine Analyse durch SDS-PAGE wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 µg Protein (pro Spur) mit 4x SDS-Probenpuffer 5 min. bei 95 °C denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

5.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (Bradford, 1976)

Es wurden jeweils 798 µl H₂O + 2 µl Proteinlösung mit 200 µl Bradford Reagenz versetzt, 5 min. bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm im Photometer (Ultraspec 2000, Fa. Pharmacia Biotech) gemessen. Parallel wurde auf gleiche Weise eine Kalibrationskurve erstellt (BSA in H₂O). Mit Hilfe der Kalibrationskurve konnte die Proteinkonzentration der unbekannten Lösung bestimmt werden.

Bradford Reagenz:	100 mg	Serva Blue G
	50 ml	Ethanol
	100 ml	Phosphorsäure
		ad 200 ml H ₂ O, Lagerung bei 4 °C

5.6.3. In-vitro Translation von Proteinen

Zur *in-vitro* Translation wurde das "*TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate*"-System (Fa. Promega) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Jeder Ansatz (50 µl) enthielt 25 µl Retikulozyten-Lysat, 2 µl Puffer, 1 µl Polymerase (je nach Vektor: Sp6-, T7- oder T3-Polymerase), 1 µl AS-Mix -Met, 1 µl RNasin (40 U/µl), 4 µl ³⁵S-markiertes Methionin (10 mCi/ml) und das DNA-Ausgangskonstrukt (1-2 µg). Aus diesem Ansatz wurden 1,5 µl durch SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert.

5.6.4. Koimmunopräzipitation von Proteinen

Für Koimmunopräzipitationen wurden COS7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (Elektroporation), von denen ein Plasmid für ein Flag-Protein kodierte. Nach 24 h wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, abgelöst, sedimentiert (1000 rpm, 5 min.) und in Flag-Lysis-Puffer aufgenommen (5.6.1). Für Flag-Immunopräzipitationen wurde die "M2 affinity gel suspension" (Fa. Sigma-Aldrich) verwendet. Es wurden für 15 Immunopräzipitationen 500 µl "M2 affinity gel suspension" eingesetzt. Die Suspension wurde durch 5-maliges Waschen mit Flag-Lysis-Puffer (inklusive 0,5 % BSA) und anschließender Resuspension in 1,5 ml Lysis-Puffer äquilibriert. Es wurden zu dem jeweiligen Zellysat (100 µg Protein-Extrakt) 100 µl äquilibrierte "M2 affinity gel suspension" und gegebenenfalls 2 µl ³⁵S markiertes *in-vitro* Translatat gegeben und über Nacht in einem Gesamtvolumen von 200-250 µl Flag-Lysis-Puffer bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min.), das Pellet 4x mit TBS-Puffer (Flag-Lysis-Puffer ohne Triton-X-100) gewaschen, in 50-100 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Wurden die immunopräzipitierten Proteine als Kinase in einem Kinase-Experiment eingesetzt, wurden diese in TBS-Puffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel kontrolliert.

Für nicht Flag-exprimierende Proteine (100 µg Protein-Extrakt) wurde ein entsprechender Antikörper verwendet. Dabei ist für die Zellyse allerdings der Immunopräzipitations-Puffer (IP-Puffer) verwendet worden. Gleiches gilt für endogene Immunopräzipitationen (bis zu 1000 µg Protein-Extrakt in einem Volumen von 500 µl). Vor Zugabe des AK ist das Zellysat mit Sepharose A prä-inkubiert worden (2 h, 4 °C). Nach Sedimentation bei 2000 rpm für 5 min. wurde der Zellysat-Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem jeweiligen AK versetzt (1 h bei 4 °C; α-CDC25C, Biodiagnostics, BM-025C-100A, (5 µl, 1,2 mg/ml) oder Santa Cruz, C-20 (10 µl, 200 µg/ml), α-C-TAK1, eigene Herstellung, (10 µl,

1 µg/µl), α-Pim-1, Santa Cruz (19F7, 10 µl, 200 µg/ml). Der Protein-Antikörper-Komplex wurde mit Sepharose A (Fa. Amersham; 0,1 g für bis zu 20 Immunopräzipitationen, prä-äquilibriert in PBS) in IP-Puffer immunopräzipitiert (2-16 h, 4 °C), bis zu 4x mit IP-Puffer gewaschen, in 50-100 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

IP-Puffer:	20 mM	Tris-HCl, pH = 7,8
	100 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	0,1 %	NP40
	1:1000	DTT + Proteinase-Inhibitoren

5.6.5. Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde das Glutathion-S-Transferase System (Fa. Pharmacia) verwendet. Dieses System ermöglicht es, GST-Fusionsproteine in Bakterien durch IPTG-Induktion in größerem Maßstab zu exprimieren (GST-Vektor: Ampicillin-resistent). Nach Transformation der jeweiligen Plasmide in REP4-Bakterien (Kanamycin-resistent) wurden diese auf Amp/Kan-LB-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Bakterien-Kolonien abgelöst, in LB-Medium (inklusive Amp/Kan) angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD von 0,4 ist die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von 1mM IPTG für 2 h induziert worden. Die Bakterien-Kultur wurde sedimentiert und das Pellet in 5 ml PBS/100 ml Bakterien-Kultur aufgenommen. Nach Lyse der Bakterien durch Ultraschall, wurde Triton-X-100 in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurde das Bakterien-Lysat bei 6000 rpm und 4 °C für 10 min. abzentrifugiert. Für 100 ml PBS-Bakterien-Suspension wurden 1 ml von der Glutathione-Sepharose-Harz-Suspension verwendet worden. Das Glutathione-Sepharose-Harz wurde durch einmaliges Waschen mit PBS äquilibriert und dem Überstand des Bakterien-Lysats hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min., wurde der Harz-GST-Fusions-Komplex drei Mal mit PBS gewaschen. Die an das Harz gekoppelten aufgereinigten Proteine wurden in PBS aufgenommen. Die Proteine wurden für Kinase-Versuche oder Interaktions-Studien verwendet. Teilweise wurden die Proteine von dem Harz mittels Elutions-Puffer (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)) eluiert und in Kinase-Experimenten eingesetzt.

5.6.6. C-TAK1-Antikörper-Herstellung

Um einen C-TAK1-Antikörper herzustellen, wurde ein C-TAK1-GST-Fusionsplasmid (GST-C-TAK1-165) kloniert. Die C-TAK1 Sequenz umfasste die ersten 165 Aminosäuren des humanen C-TAK1-Proteins (Primer: C-TAK1-22, C-TAK1-18). Nach der rekombinanten Expression in Bakterien und Aufreinigung des Fusionsproteins wurde das C-TAK1-Peptid

mittels Thrombin (50 U, 16 h) eluiert. Das Peptid wurde gegen PBS dialysiert (4 °C, 4 h). Zum Immunisieren wurden pro Kaninchen 500 µg Peptid eingesetzt (Fa. Bioscience). Das erhaltene finale Antikörper-Serum wurde mittels des GST-C-TAK1-165-Fusionsproteins aufgereinigt. Dabei wurden die Antikörper aus dem Serum an das aufgereinigte GST-C-TAK-Fusionsprotein gekoppelt, 5x mit PBS gewaschen (inkl. 0,1 % Natriumazid) und mit Tris-HCl (pH 2 und 3) eluiert. Die Antikörper-Lösung wurde mit acetyliertem BSA auf 1 µg/µl eingestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Der AK wurde für Immunoblots in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:3000 und in Immunfluoreszenzen von 1:100 eingesetzt.

5.6.7. Kopräzipitation von Proteinen in-vitro

Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden in einem Gesamtvolumen von 150-200 µl NETN-Puffer mit 4 µl ³⁵S-markierten *in-vitro* Translataten oder mit 100 µg Zellysat versetzt und 2-16 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert.

NETN-Puffer:	25 mM	Tris-Cl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	0,2 %	NP-40
	1:1000	DTT/ Proteinase-Inhibitoren (vor Gebrauch zugeben)
	0,25 mg/ml	BSA (vor Gebrauch zugeben)

Nach der Inkubation wurden die Proben bei 2000 rpm, 4 min. abzentrifugiert und die GST-Pellets drei Mal mit NETN-Puffer gewaschen (ohne BSA). Letztendlich wurden die GST-Pellets in 50 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

5.6.8. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Proteine wurden in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (8-15 %, je nach Größe der Proteine) elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur (Fa. Keutz) aufgetrennt. Alle Proteinproben wurden vorher 5 min. bei 95 °C in 4x SDS-Probenpuffer denaturiert und in 1x SDS-Laufpuffer bei 20-30 mA ca. 2-4 h aufgetrennt. Für den immunologischen Nachweis wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran transferiert (5.6.9). Zur Detektion von ³⁵S-Methionin markierten Proteinen wurde das Gel anschließend für 45 min. in Fixierlösung fixiert, Comassie gefärbt, anschließend entfärbt (mit der Fixierlösung), 2 h bei 80 °C getrocknet und ü. N. mit einem Film oder einer Imager-Platte exponiert. Zur Detektion der radioaktiv-markierten Proteine im Kinase-Experiment ([³²P]ATP) wurden die Gele fixiert, getrocknet und exponiert.

10 % APS-Lösung	10 %	Ammoniumpersulfat
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	Tris-HCl, pH 8,8 SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	Tris-HCl, pH 6,8 SDS
10x SDS-Laufpuffer	1,25 M 2 M 1 %	Tris-Base Glycin SDS
4x SDS-Probenpuffer	62 mM 2 % 10 % 5 % 5 % 0,025 %	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin DTT β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Rotiphorese Gel30	30 % 0,8 %	Acrylamid Bisacrylamid
Fixierlösung	10 % 30 %	Essigsäure Ethanol
Comassie-Färbelösung	45 % 45 % 10 % 1,25 g/l	H ₂ O Ethanol Essigsäure Comassie R250

5.6.9. Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot (Immunoblot))

Zum Transfer von Proteinen auf Nylonmembranen wurde das Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der Fa. Keutz oder BIO-RAD) angewendet. Dazu wurde auf der (Graphit)-Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: drei Whatman 3MM-Papiere angefeuchtet mit Transfer-Puffer, eine Hybond C Membran (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) mit Transfer-Puffer angefeuchtet, Proteingel und abschließend drei Whatman 3MM-Papiere mit Transfer-Puffer angefeuchtet. Es wurde 1,5 bis 2 h bei 1,5 mA/cm² transferiert. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit PonceauS (0,2 % in 0,3 % Trichloressigsäure) angefärbt und anschließend mit PBS oder bidest Wasser wieder entfärbt. Zum Nachweis der Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung abgesättigt (Inkubationszeit 30 min.). Anschließend wurde der Blot mit dem 1. AK in Blockierlösung für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die jeweiligen 1. AK 1:1000 eingesetzt worden (α-GST (PC53, Calbiochem), α-Pim-1 (19F7, Santa Cruz), α-C-TAK1 (eigene Herstellung, 1:1000-1:3000), α-CDC25C (BM-025C-100A, Biodiagnostic; C-20, Santa Cruz), α-LexA (Santa Cruz, 2-12), α-VP16 (Santa Cruz, 1-21) und α-Flag (Sigma, M2)). Die Membran wurde 4x mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen und für 1 h mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten 2. AK

(1:5000 in Blockierlösung, HRPO-markiert Esel α -Maus/ Hase/ Ziege/ Schaf IgG (H+L) F(ab)₂-Fragment (Fa. Dianova)) bei RT inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit 0,05 % Tween 20 in PBS wurde der Immunoblot entwickelt. Hierzu wurden 10 ml der ECL Entwicklerlösung mit 3,1 μ l H₂O₂ (30 %) gemischt oder das Lumi-Light-Plus Western Blotting Substrat (Fa. Roche) verwendet, der Blot 1 min. in der aktivierten Entwicklerlösung geschwenkt und anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein Röntgenfilm (Fa. Amersham) wurde aufgelegt und nach 30 sek. bis 5 min. entwickelt.

Transfer-Puffer:	5,82 g/l 2,93 g/l 3,75 ml 200 ml	Tris-Base Glycin 10 % SDS Methanol ad 1000 ml bidest Wasser,
Blockierlösung:	2 % 0,05 %	Magermilchpulver Tween 20 in PBS
ECL-Entwicklerlösung	10 ml/l 4,45 ml/l	ECL-A (250 mM Luminol in DMSO) ECL-B (90 mM p-Coumarsäure in DMSO) in 100 ml Tris/HCl, pH 8,5, lichtgeschützt bei RT lagern, H ₂ O ₂ (1:3000) vor Gebrauch dazugeben

5.6.10. Kinase-Experimente

Für die Kinase-Experimente wurden entweder aufgereinigte GST- (an der Matrix-hängend (=beads) oder eluiert) oder immunopräzipitierte Flag-Proteine verwendet. Nach Kombinieren der Proben wurden diese abzentrifugiert (4000 rpm, 4 min.). Gegebenenfalls wurden die als Substrat dienenden rekombinanten Proteine Histon H1 (als Kontrolle, 2 μ g) oder CDC25C (2 μ g) zugegeben und der Ansatz mit 40 μ l Kinase-Puffer inklusive [γ^{32} P]ATP (Fa. Amersham) versetzt.

Pim-1 Kinase-Puffer:	20 mM 5 mM 7 mM 10 μ M 10 μ Ci (1 μ l)	PIPES, pH 7,0 MnCl ₂ β -Mercaptoethanol ATP [γ^{32} P] ATP pro Ansatz
C-TAK1-Kinase-Puffer:	50 mM 10 mM 10 μ M 10 μ Ci (1 μ l)	Tris-HCl, pH 7,4 MgCl ₂ ATP [γ^{32} P] ATP pro Ansatz

Die Proben wurden 30 min. bei 30 °C (Pim-1-Kinase-Bedingungen) oder 20 °C (C-TAK1-Kinase-Bedingungen) inkubiert. Nach dem Beenden der Reaktion durch Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS-Gel ist

anschließend fixiert und getrocknet worden. Das Auswerten der Kinase-Experimente erfolgte mittels Autoradiographie.

5.6.11. C-TAK1 Inaktivierungs-Experiment

Hierbei war zu beachten, dass man nach dem 1. Kinase-Versuch beide Proteine wieder trennen musste. Dieses wurde dadurch erreicht, dass als Kinase Pim-1-Eluat und als Substrat C-TAK1-beads verwendet worden waren. Nach dem 1. Kinase-Versuch (Pim-1-Kinase-Puffer) wurde das Pim-1-Protein mit dem Überstand nach Zentrifugation verworfen und das C-TAK1-Pellet mit C-TAK1-Kinase-Puffer ein Mal gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in C-TAK1-Kinase-Puffer, welcher mit dem neuen Substrat versetzt worden war (CDC25C-Protein), aufgenommen. Während C-TAK1 im ersten Kinase-Versuch Substrat war, wurde C-TAK1 im 2. Kinase-Versuch als Kinase verwendet. Die Proben wurden 30 min. bei 20 °C (C-TAK1-Kinase-Bedingungen) inkubiert. Nach dem Beenden der Reaktion durch Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde anschließend fixiert und getrocknet. Das Auswerten der Kinase-Experimente erfolgte mittels Autoradiographie.

5.6.12. Phosphatase-Experiment

Für das Phosphatase-Experiment sind weder DTT noch Proteinase-Inhibitoren verwendet worden, da in dem Inhibitor-Mix Phosphatase-Inhibitoren enthalten waren. Dem Phosphatase-Experiment ist ein Kinase-Experiment (5.6.11) vorgeschaltet. Dabei ist nur ATP verwendet worden. Das Experiment wurde so angelegt, dass das Kinase-Experiment parallel einmal mit und einmal ohne ATP als Negativ-Kontrolle durchgeführt worden war. Die Kinase-Reaktion wurde durch das einmalige Waschen mit Phosphatase-Puffer (ohne p-NPP) gestoppt. Das Pellet wurde in 800 µl Phosphatase-Puffer resuspendiert und für 2 h bei 30 °C (CDC25C) oder 90 min. bei 37 °C (CDC25A) inkubiert. Nachdem die Phosphatase-Reaktion durch Zugabe von 10 M NaOH (Endkonz.: 200 µM) beendet worden war, wurde die Aktivität durch eine photometrische Messung bei OD = 410 nm bestimmt. Die Aktivitäten von sowohl CDC25C als auch die von CDC25A ohne ATP wurden = 1 gesetzt.

Phosphatase-Puffer	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	50 mM	NaCl
	10 mM	EDTA
	50 mM	p-Nitrophenyl Phosphat (p-NPP)

Die Kinase-Aktivität von Pim-1-wt und Pim-1-K67M wurde in einem normalen Kinase-Experiment überprüft.

6. Literaturverzeichnis

- Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. C., and Doree, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* *111*, 1751-7.
- Adams, P. D., and Kaelin, W. G., Jr. (1998). Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 791-7.
- Alevizos, I., Mahadevappa, M., Zhang, X., Ohyama, H., Kohno, Y., Posner, M., Gallagher, G. T., Varvares, M., Cohen, D., Kim, D., Kent, R., Donoff, R. B., Todd, R., Yung, C. M., Warrington, J. A., and Wong, D. T. (2001). Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* *20*, 6196-204.
- Allen, J. D., Verhoeven, E., Domen, J., van der Valk, M., and Berns, A. (1997). Pim-2 transgene induces lymphoid tumors, exhibiting potent synergy with c-myc. *Oncogene* *15*, 1133-41.
- Aronheim, A., Broder, Y. C., Cohen, A., Fritsch, A., Belisle, B., and Abo, A. (1998). Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* *8*, 1125-8.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J., and Karin, M. (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein- protein interactions. *Mol Cell Biol* *17*, 3094-102.
- Ausubel F.M, B. R., kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*: Wiley Interscience).
- Autret, S., Levine, A., Holland, I. B., and Seror, S. J. (1997). Cell cycle checkpoints in bacteria. *Biochimie* *79*, 549-54.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., and Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J* *19*, 2056-68.
- Baldin, V., and Ducommun, B. (1995). Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *J Cell Sci* *108*, 2425-32.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* *7*, 812-21.
- Baumgartner, R., Fernandez-Catalan, C., Winoto, A., Huber, R., Engh, R. A., and Holak, T. A. (1998). Structure of human cyclin-dependent kinase inhibitor p19INK4d: comparison to known ankyrin-repeat-containing structures and implications for the dysfunction of tumor suppressor p16INK4a. *Structure* *6*, 1279-90.
- Baytel, D., Shalom, S., Madgar, I., Weissenberg, R., and Don, J. (1998). The human Pim-2 proto-oncogene and its testicular expression. *Biochim Biophys Acta* *1442*, 274-85.
- Bhattacharya, N., Wang, Z., Davitt, C., McKenzie, I. F., Xing, P. X., and Magnuson, N. S. (2002). Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* *111*, 80-95.
- Blasina, A., de Weyer, I. V., Laus, M. C., Luyten, W. H., Parker, A. E., and McGowan, C. H. (1999). A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr Biol* *9*, 1-10.
- Borg, K. E., Zhang, M., Hegge, D., Stephen, R. L., Buckley, D. J., Magnuson, N. S., and Buckley, A. R. (1999). Prolactin regulation of pim-1 expression: positive and negative promoter elements. *Endocrinology* *140*, 5659-68.

- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18, 5321-33.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Breuer, M. L., Cuypers, H. T., and Berns, A. (1989). Evidence for the involvement of pim-2, a new common proviral insertion site, in progression of lymphomas. *Embo J* 8, 743-8.
- Broder, Y. C., Katz, S., and Aronheim, A. (1998). The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr Biol* 8, 1121-4.
- Brotherton, D. H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P. J., Volynik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B. O., Archer, S. J., Serrano, M., Brenner, S. L., Blundell, T. L., and Laue, E. D. (1998). Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature* 395, 244-50.
- Buckley, A. R., Buckley, D. J., Leff, M. A., Hoover, D. S., and Magnuson, N. S. (1995). Rapid induction of pim-1 expression by prolactin and interleukin-2 in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 136, 5252-9.
- Canman, C. E., and Kastan, M. B. (1996). Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature* 384, 213-4.
- Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., and Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15, 2682-8.
- Chen, X. P., Losman, J. A., Cowan, S., Donahue, E., Fay, S., Vuong, B. Q., Nawijn, M. C., Capece, D., Cohan, V. L., and Rothman, P. (2002). Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2175-80.
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-5.
- Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., and Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 849-52.
- Cogswell, J. P., Brown, C. E., Bisi, J. E., and Neill, S. D. (2000). Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. *Cell Growth Differ* 11, 615-23.
- Cuypers, H. T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E. R., Boelens, W., van Wezenbeek, P., Melief, C., and Berns, A. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 37, 141-50.
- Cuypers, H. T., Selten, G. C., Zijlstra, M., de Goede, R. E., Melief, C. J., and Berns, A. J. (1986). Tumor progression in murine leukemia virus-induced T-cell lymphomas: monitoring clonal selections with viral and cellular probes. *J Virol* 60, 230-41.
- Dalal, S. N., Schweitzer, C. M., Gan, J., and DeCaprio, J. A. (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* 19, 4465-79.
- Demoulin, J. B., Van Roost, E., Stevens, M., Groner, B., and Renauld, J. C. (1999). Distinct roles for STAT1, STAT3, and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by interleukin-9. *J Biol Chem* 274, 25855-61.
- Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-6.

- Domen, J., van der Lugt, N. M., Acton, D., Laird, P. W., Linders, K., and Berns, A. (1993a). Pim-1 levels determine the size of early B lymphoid compartments in bone marrow. *J Exp Med* 178, 1665-73.
- Domen, J., van der Lugt, N. M., Laird, P. W., Saris, C. J., and Berns, A. (1993b). Analysis of Pim-1 function in mutant mice. *Leukemia* 7 Suppl 2, S108-12.
- Domen, J., van der Lugt, N. M., Laird, P. W., Saris, C. J., Clarke, A. R., Hooper, M. L., and Berns, A. (1993c). Impaired interleukin-3 response in Pim-1-deficient bone marrow-derived mast cells. *Blood* 82, 1445-52.
- Drapkin, R., Le Roy, G., Cho, H., Akoulitchiev, S., and Reinberg, D. (1996). Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6488-93.
- Eichmann, A., Yuan, L., Breant, C., Alitalo, K., and Koskinen, P. J. (2000). Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene* 19, 1215-24.
- el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y., and et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-74.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-25.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-96.
- Fesquet, D., Labbe, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M., and Cavadore, J. C. (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J* 12, 3111-21.
- Fisher, R. P., and Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-24.
- Friedmann, M., Nissen, M. S., Hoover, D. S., Reeves, R., and Magnuson, N. S. (1992). Characterization of the proto-oncogene pim-1: kinase activity and substrate recognition sequence. *Arch Biochem Biophys* 298, 594-601.
- Funk, J. O., and Galloway, D. A. (1998). Inhibiting CDK inhibitors: new lessons from DNA tumor viruses. *Trends Biochem Sci* 23, 337-41.
- Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M. N., McGowan, C. H., and Russell, P. (1999). Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell* 10, 833-45.
- Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147, 295-306.
- Gaidano, G., and Dalla-Favera, R. (1993). Biologic and molecular characterization of non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol* 5, 776-84.
- Garrett, S., Barton, W. A., Knights, R., Jin, P., Morgan, D. O., and Fisher, R. P. (2001). Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop. *Mol Cell Biol* 21, 88-99.
- Garrington, T. P., and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-8.

- Geisen, C., and Moroy, T. (2002). The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. *J Biol Chem* 30, 30.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-79.
- Glutzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-8.
- Graves, P. R., Lovly, C. M., Uy, G. L., and Piwnica-Worms, H. (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* 20, 1839-51.
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-99.
- Haas, K., Staller, P., Geisen, C., Bartek, J., Eilers, M., and Moroy, T. (1997). Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene* 15, 179-92.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., and Pines, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 9, 680-9.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., and Pines, J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *Embo J* 17, 4127-38.
- Hall, M., and Peters, G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68, 67-108.
- Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-61.
- Hannon, G. J., Casso, D., and Beach, D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1731-5.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-16.
- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., and Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-34.
- Heald, R., McLoughlin, M., and McKeon, F. (1993). Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74, 463-74.
- Hengst, L., and Reed, S. I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 25-41.
- Hirama, T., and Koeffler, H. P. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86, 841-54.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-41.

- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* 12, 53-63.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Horseman, N. D. (1995). Prolactin, proliferation, and protooncogenes. *Endocrinology* 136, 5249-51.
- Hubsman, M., Yudkovsky, G., and Aronheim, A. (2001). A novel approach for the identification of protein-protein interaction with integral membrane proteins. *Nucleic Acids Res* 29, E18.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333-46.
- Ishibashi, Y., Maita, H., Yano, M., Koike, N., Tamai, K., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S. M. (2001). Pim-1 translocates sorting nexin 6/TRAFF4-associated factor 2 from cytoplasm to nucleus. *FEBS Lett* 506, 33-8.
- Jackman, M., Firth, M., and Pines, J. (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *Embo J* 14, 1646-54.
- Jackson, P. K. (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* 15, 3053-8.
- Jackson, P. K., Chevalier, S., Philippe, M., and Kirschner, M. W. (1995). Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21CIP1. *J Cell Biol* 130, 755-69.
- Jacobs, H., Krimpenfort, P., Haks, M., Allen, J., Blom, B., Demolliere, C., Kruisbeek, A., Spits, H., and Berns, A. (1999). PIM1 reconstitutes thymus cellularity in interleukin 7- and common gamma chain-mutant mice and permits thymocyte maturation in Rag- but not CD3gamma-deficient mice. *J Exp Med* 190, 1059-68.
- Jaster, R., Tschirch, E., Bittorf, T., and Brock, J. (1999a). Interferon-alpha inhibits proliferation of Ba/F3 cells by interfering with interleukin-3 action. *Cell Signal* 11, 769-75.
- Jaster, R., Tschirch, E., Bittorf, T., and Brock, J. (1999b). Role of STAT5 in interferon-alpha signal transduction in Ba/F3 cells. *Cell Signal* 11, 331-5.
- Jin, P., Hardy, S., and Morgan, D. O. (1998). Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J Cell Biol* 141, 875-85.
- Johnson, D. G. (2000). The paradox of E2F1: oncogene and tumor suppressor gene. *Mol Carcinog* 27, 151-7.
- Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713-8.
- Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitian, S. V., Stockert, E., Day, R. S., 3rd, Johnson, B. E., and Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-40.
- Kang, D., Chen, J., Wong, J., and Fang, G. (2002). The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *J Cell Biol* 156, 249-59.
- Karsunky, H., Geisen, C., Schmidt, T., Haas, K., Zevnik, B., Gau, E., and Moroy, T. (1999). Oncogenic potential of cyclin E in T-cell lymphomagenesis in transgenic mice: evidence for cooperation between cyclin E and Ras but not Myc. *Oncogene* 18, 7816-24.
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., and Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79, 487-96.

- Kawabe, T., Suganuma, M., Ando, T., Kimura, M., Hori, H., and Okamoto, T. (2002). Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* 21, 1717-26.
- Kawashima, T., Murata, K., Akira, S., Tono-zuka, Y., Minoshima, Y., Feng, S., Kumagai, H., Tsuruga, H., Ikeda, Y., Asano, S., Nosaka, T., and Kitamura, T. (2001). STAT5 induces macrophage differentiation of M1 leukemia cells through activation of IL-6 production mediated by NF-kappaB p65. *J Immunol* 167, 3652-60.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J. P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3, 1279-94.
- Koh, J., Enders, G. H., Dynlacht, B. D., and Harlow, E. (1995). Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 375, 506-10.
- Koike, N., Maita, H., Taira, T., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S. M. (2000). Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS Lett* 467, 17-21.
- Krause, K., Haugwitz, U., Wasner, M., Wiedmann, M., Mossner, J., and Engeland, K. (2001). Expression of the cell cycle phosphatase cdc25C is down-regulated by the tumor suppressor protein p53 but not by p73. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 743-50.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev* 13, 1067-72.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 273, 1377-80.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Leduc, I., Karsunky, H., Mathieu, N., Schmidt, T., Verthuy, C., Ferrier, P., and Moroy, T. (2000). The Pim-1 kinase stimulates maturation of TCRbeta-deficient T cell progenitors: implications for the mechanism of Pim-1 action. *Int Immunol* 12, 1389-96.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-49.
- Lees, E. M., and Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 1194-201.
- Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M., and Julkunen, I. (2002). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 71, 511-9.
- Levenson, J. D., Koskinen, P. J., Orrico, F. C., Rainio, E. M., Jalkanen, K. J., Dash, A. B., Eisenman, R. N., and Ness, S. A. (1998). Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol Cell* 2, 417-25.
- Li, J., Meyer, A. N., and Donoghue, D. J. (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 502-7.
- Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A., and Xiong, Y. (1994). Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9, 2261-8.
- Lilly, M., and Kraft, A. (1997). Enforced expression of the Mr 33,000 Pim-1 kinase enhances factor-independent survival and inhibits apoptosis in murine myeloid cells. *Cancer Res* 57, 5348-55.

- Lilly, M., Sandholm, J., Cooper, J. J., Koskinen, P. J., and Kraft, A. (1999). The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* 18, 4022-31.
- Lin, J., Tang, H., Jin, X., Jia, G., and Hsieh, J. T. (2002). p53 regulates Stat3 phosphorylation and DNA binding activity in human prostate cancer cells expressing constitutively active Stat3. *Oncogene* 21, 3082-8.
- Lipinski, K. S., Fax, P., Wilker, B., Hennemann, H., Brockmann, D., and Esche, H. (1999). Differences in the interactions of oncogenic adenovirus 12 early region 1A and nononcogenic adenovirus 2 early region 1A with the cellular coactivators p300 and CBP. *Virology* 255, 94-105.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-9.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375, 503-6.
- Maita, H., Harada, Y., Nagakubo, D., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Takahashi, K., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S. M. (2000). PAP-1, a novel target protein of phosphorylation by pim-1 kinase. *Eur J Biochem* 267, 5168-78.
- Makela, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., and Weinberg, R. A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* 371, 254-7.
- Maroun, M., and Aronheim, A. (1999). A novel in vivo assay for the analysis of protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res* 27, e4.
- Marshall, C. (1999). How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 11, 732-6.
- Matikainen, S., Sareneva, T., Ronni, T., Lehtonen, A., Koskinen, P. J., and Julkunen, I. (1999). Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood* 93, 1980-91.
- Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9, 650-62.
- Matsushime, H., Ewen, M. E., Strom, D. K., Kato, J. Y., Hanks, S. K., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71, 323-34.
- Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14, 2077-86.
- Mizuno, K., Shirogane, T., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Hibi, M., and Hirano, T. (2001). Regulation of Pim-1 by Hsp90. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 663-9.
- Mochizuki, T., Kitanaka, C., Noguchi, K., Muramatsu, T., Asai, A., and Kuchino, Y. (1999). Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 18659-66.
- Moore, J. D., Yang, J., Truant, R., and Kornbluth, S. (1999). Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol* 144, 213-24.

- Moroy, T., Verbeek, S., Ma, A., Achacoso, P., Berns, A., and Alt, F. (1991). E mu N- and E mu L-myc cooperate with E mu pim-1 to generate lymphoid tumors at high frequency in double-transgenic mice. *Oncogene* 6, 1941-8.
- Morris, L., Allen, K. E., and La Thangue, N. B. (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol* 2, 232-9.
- Mount, S. M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10, 459-72.
- Mowat, M. R. (1998). p53 in tumor progression: life, death, and everything. *Adv Cancer Res* 74, 25-48.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270, 86-90.
- Mullan, P. B., Quinn, J. E., Gilmore, P. M., McWilliams, S., Andrews, H., Gervin, C., McCabe, N., McKenna, S., White, P., Song, Y. H., Maheswaran, S., Liu, E., Haber, D. A., Johnston, P. G., and Harkin, D. P. (2001). BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene* 20, 6123-31.
- Muller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnicka-Worms, H., and Morrison, D. K. (2001). C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* 8, 983-93.
- Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* 20, 1020-9.
- Narimatsu, M., Maeda, H., Itoh, S., Atsumi, T., Ohtani, T., Nishida, K., Itoh, M., Kamimura, D., Park, S. J., Mizuno, K., Miyazaki, J., Hibi, M., Ishihara, K., Nakajima, K., and Hirano, T. (2001). Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol* 21, 6615-25.
- Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Kossev, P., Wasik, M. A., and Skorski, T. (2002). Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* 99, 4531-9.
- Nigg, E. A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 8, 312-7.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D. A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753-6.
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A. L., and Kitamura, T. (1999). STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo J* 18, 4754-65.
- Nosaka, T., and Kitamura, T. (2002). Pim-1 expression is sufficient to induce cytokine independence in murine hematopoietic cells, but is dispensable for BCR-ABL-mediated transformation. *Exp Hematol* 30, 697-702.
- Ohi, R., and Gould, K. L. (1999). Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11, 267-73.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15, 2612-24.
- Padma, R., and Nagarajan, L. (1991). The human PIM-1 gene product is a protein serine kinase. *Cancer Res* 51, 2486-9.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-71.

- Palaty, C. K., Clark-Lewis, I., Leung, D., and Pelech, S. L. (1997a). Phosphorylation site substrate specificity determinants for the Pim-1 protooncogene-encoded protein kinase. *Biochem Cell Biol* 75, 153-62.
- Palaty, C. K., Kalmar, G., Tai, G., Oh, S., Amankawa, L., Affolter, M., Aebersold, R., and Pelech, S. L. (1997b). Identification of the autophosphorylation sites of the *Xenopus laevis* Pim-1 proto-oncogene-encoded protein kinase. *J Biol Chem* 272, 10514-21.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-6.
- Pearson, R., and Weston, K. (2000). c-Myb regulates the proliferation of immature thymocytes following beta-selection. *Embo J* 19, 6112-20.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Ogg, S., Thoma, R. S., Byrnes, M. J., 3rd, Wu, Z., Stephenson, M. T., and Piwnica-Worms, H. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ* 9, 197-208.
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* 18, 5310-20.
- Peto, R., Roe, F. J., Lee, P. N., Levy, L., and Clack, J. (1975). Cancer and ageing in mice and men. *Br J Cancer* 32, 411-26.
- Pines, J., and Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J* 13, 3772-81.
- Pircher, T. J., Zhao, S., Geiger, J. N., Jones, B., and Wojchowski, D. M. (2000). Pim-1 kinase protects hematopoietic FDC cells from genotoxin-induced death. *Oncogene* 19, 3684-92.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.
- Qian, Y. W., Erikson, E., Taieb, F. E., and Maller, J. L. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 12, 1791-9.
- Rainio, E. M., Sandholm, J., and Koskinen, P. J. (2002). Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol* 168, 1524-7.
- Resnitzky, D., and Reed, S. I. (1995). Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol* 15, 3463-9.
- Rodel, B., Tavassoli, K., Karsunky, H., Schmidt, T., Bachmann, M., Schaper, F., Heinrich, P., Shuai, K., Elsassner, H. P., and Moroy, T. (2000). The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *Embo J* 19, 5845-55.
- Rodriguez-Puebla, M. L., Robles, A. I., and Conti, C. J. (1999). ras activity and cyclin D1 expression: an essential mechanism of mouse skin tumor development. *Mol Carcinog* 24, 1-6.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-8.
- Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, F115-77.

- Russo, A. A., Tong, L., Lee, J. O., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 395, 237-43.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-103.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-6.
- Sambrook J., F. E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*: CSH-Laboratory Press.).
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-501.
- Saris, C. J., Domen, J., and Berns, A. (1991). The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *Embo J* 10, 655-64.
- Scheijen, B., Jonkers, J., Acton, D., and Berns, A. (1997). Characterization of pal-1, a common proviral insertion site in murine leukemia virus-induced lymphomas of c-myc and Pim-1 transgenic mice. *J Virol* 71, 9-16.
- Schmidt, D., and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2872-7.
- Schmidt, T., Karsunky, H., Gau, E., Zevnik, B., Elsasser, H. P., and Moroy, T. (1998a). Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 17, 2661-7.
- Schmidt, T., Karsunky, H., Rodel, B., Zevnik, B., Elsasser, H. P., and Moroy, T. (1998b). Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection. *Embo J* 17, 5349-59.
- Schmidt, T., Zornig, M., Beneke, R., and Moroy, T. (1996). MoMuLV proviral integrations identified by Sup-F selection in tumors from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene. *Nucleic Acids Res* 24, 2528-34.
- Schneider, E., Kartarius, S., Schuster, N., and Montenarh, M. (2002). The cyclin H/cdk7/Mat1 kinase activity is regulated by CK2 phosphorylation of cyclin H. *Oncogene* 21, 5031-7.
- Schneider, E., Montenarh, M., and Wagner, P. (1998). Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene* 17, 2733-41.
- Schuermann, M., Neuberg, M., Hunter, J. B., Jenuwein, T., Ryseck, R. P., Bravo, R., and Muller, R. (1989). The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for trans-formation. *Cell* 56, 507-16.
- Selten, G., Cuypers, H. T., and Berns, A. (1985). Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T- cell lymphomas. *Embo J* 4, 1793-8.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Boelens, W., Robanus-Maandag, E., Verbeek, J., Domen, J., van Beveren, C., and Berns, A. (1986). The primary structure of the putative oncogene pim-1 shows extensive homology with protein kinases. *Cell* 46, 603-11.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Zijlstra, M., Melief, C., and Berns, A. (1984). Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *Embo J* 3, 3215-22.

- Serrano, M., Hannon, G. J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-7.
- Shaulian, E., Zauberman, A., Milner, J., Davies, E. A., and Oren, M. (1993). Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppress transformation. *Embo J* 12, 2789-97.
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-5.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-65.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-12.
- Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J. M., Shima, D. T., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11, 709-19.
- Stukenberg, P. T., and Kirschner, M. W. (2001). Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25. *Mol Cell* 7, 1071-83.
- Svejstrup, J. Q., Vichi, P., and Egly, J. M. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIID. *Trends Biochem Sci* 21, 346-50.
- Takizawa, C. G., and Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1- Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* 12, 658-65.
- Takizawa, C. G., Weis, K., and Morgan, D. O. (1999). Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7938-43.
- Tassan, J. P., Schultz, S. J., Bartek, J., and Nigg, E. A. (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* 127, 467-78.
- Temple, R., Allen, E., Fordham, J., Phipps, S., Schneider, H. C., Lindauer, K., Hayes, I., Lockey, J., Pollock, K., and Jupp, R. (2001). Microarray analysis of eosinophils reveals a number of candidate survival and apoptosis genes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 425-33.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 3, 341-8.
- van der Lugt, N. M., Domen, J., Verhoeven, E., Linders, K., van der Gulden, H., Allen, J., and Berns, A. (1995). Proviral tagging in E mu-myc transgenic mice lacking the Pim-1 proto- oncogene leads to compensatory activation of Pim-2. *Embo J* 14, 2536-44.
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Krimpenfort, P., Domen, J., Saris, C., Radaszkiewicz, T., and Berns, A. (1989). Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* 56, 673-82.
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991). Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65, 737-52.
- Venkataramani, R., Swaminathan, K., and Marmorstein, R. (1998). Crystal structure of the CDK4/6 inhibitory protein p18INK4c provides insights into ankyrin-like repeat structure/function and tumor-derived p16INK4 mutations. *Nat Struct Biol* 5, 74-81.

- Vogelstein, B. (1990). Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 348, 681-2.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-8.
- Wang, Z., Bhattacharya, N., Meyer, M. K., Seimiya, H., Tsuruo, T., Tonani, J. A., and Magnuson, N. S. (2001). Pim-1 negatively regulates the activity of PTP-U2S phosphatase and influences terminal differentiation and apoptosis of monoblastoid leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 390, 9-18.
- Weinert, T. (1998). DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* 94, 555-8.
- Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B., and Beach, D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-9.
- Yang, J., Bardes, E. S., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A., and Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 12, 2131-43.
- Yang, X., Li, D. M., Chen, W., and Xu, T. (2001). Human homologue of *Drosophila* lats, LATS1, negatively regulate growth by inducing G(2)/M arrest or apoptosis. *Oncogene* 20, 6516-23.
- Yao, Y., Slosberg, E. D., Wang, L., Hibshoosh, H., Zhang, Y. J., Xing, W. Q., Santella, R. M., and Weinstein, I. B. (1999). Increased susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors in MMTV- Cdc25B transgenic mice. *Oncogene* 18, 5159-66.
- Yarden, R. I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K. H., and Brody, L. C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30, 285-9.
- Yip-Schneider, M. T., Horie, M., and Broxmeyer, H. E. (1995). Transcriptional induction of pim-1 protein kinase gene expression by interferon gamma and posttranscriptional effects on costimulation with steel factor. *Blood* 85, 3494-502.
- Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., and Fornace, A. J., Jr. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892-900.
- Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.
- Zhou, X. Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P. J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., and Lu, K. P. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 6, 873-83.
- Zhu, N., Ramirez, L. M., Lee, R. L., Magnuson, N. S., Bishop, G. A., and Gold, M. R. (2002). CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *J Immunol* 168, 744-54.
- Zornig, M., Schmidt, T., Karsunky, H., Grzeschiczek, A., and Moroy, T. (1996). Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2. *Oncogene* 12, 1789-801.

7. Anhang

7.1. Plasmide und Oligodesoxynukleotide zur Klonierung

7.1.1. Hefe-Plasmide

pYesMdpA:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H.Hennemann, eigenes Labor Der verwendete Bibliotheksvektor enthält eine Gal1-Promotor getriebene Expressionskassette mit Myristylierungs-Signal von v-src und einen stromabwärtsgelegenen polylinker
cDNA-Bibliothek:	GC1-B1-6: gerichtet kloniert (<i>SmaI/ EcoRI</i>) in YesMdpA
pADNS-RRS:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H.Hennemann, eigenes Labor
pADNS-Pim-1-K67M-RRS:	5'-Pr., <i>HindIII</i> , 5'-CTAAGCTTGCCACCATGCTCTTGTCCTCAAAATCAAC-3'; Pim1baits 3'-Primer: <i>EcoRV</i> , 5'-ATGATATCTTTGCTGGGCCCCGGCGACAG-3'; Pim1baits Ausgangskonstrukt: pCDNA3-Pim-1-K67M, in pADNS-RRS (<i>HindIII</i> , <i>SmaI</i>)
Jun-ZRas:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H.Hennemann, eigenes Labor
M-Fos:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H.Hennemann, eigenes Labor
GAP:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H.Hennemann, eigenes Labor
C-TAK1-Y6131	GC-BY6131; isolierter Klon aus dem Hefe-Interaktions-Experiment
Fehler-PCR in Hefe:	5'-Primer, 5'-TACCTCTATACTTTAACGTC-3'; Galprom 3'-Primer 5'-GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGC-3'; Yes2b3 Ausgangskonstrukt: C-TAK1-Y6131
C-TAK1-Y6131-L128P:	nicht-interagierende C-TAK1-Y6131-Punktmutante
LexA-Pim-1-K67M:	5'-Primer: <i>BamHI</i> , 5'-GCGGATCCATGCTCTTGTCCTCAAAATC-3'; Pim1Lexs 3'-Pr.: <i>XhoI</i> , Stop, <i>EcoRI</i> , 5'-CGGAATTCTACTCGAGTTTGCTGGGCCC-3'; Pim1Lexs Ausgangskonstrukt: Pim-1-K67M-RRS; das PCR-Fragment wurde in pBSK als Zwischenklon inseriert und mit einem Teilverdau in den LexA-Vektor (<i>BamHI</i> , in Leserahmen, und <i>EcoRI</i>) kloniert. Der LexA-Vektor wird angetrieben durch den Met-Promotor (Met25), kodiert für das LexA-Protein, für eine Ampicillin-Resistenz und einen auxotrophen Marker TRP1.
LexA-Gfi-G:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K.Tavassoli, eigenes Labor
VP16-C-TAK1-Y6131:	5'-Primer: <i>BamHI</i> , 5'-TTGGATCCATGTCCACTAGGACCCC-3'; 3'-Primer: <i>XhoI</i> , 5'-CGCTCGAGTTACTCTCTCAGTTCCTTCAG-3'; Ausgangskonstrukt: GC-BY6131 inseriert in VP16-Gfi-1; Der Vektor wird durch einen Galaktose-Promotor angetrieben, kodiert für die transaktivierende Domäne des VP16-Proteins des HSV-1, eine Ampicillin-Resistenz und einen auxotrophen Marker LEU2.

7.1.2. Bakterielle und Eukaryotische Expressions-Plasmide

CMV-GFP-N3	eukaryotischer Expressions-Vektor, der von einem CMV-Promotor angetrieben wird und für einen Kanamycin-Resistenz-Marker, das GFP-Tag (3' von der MCS) und für die SV40-poly(A)-Sequenz kodiert (Fa. Clontech).
CMV-Flag-N3	eukaryotischer Expressions-Vektor, der von einem CMV-Promotor angetrieben wird und für einen Kanamycin-Resistenz-Marker, das Flag-Tag (3' von der MCS) und für die SV40-poly(A)-Sequenz kodiert (modifizierter GFP-Vektor).
pCDNA3	eukaryotischer Expressions-Vektor, der von einem CMV-Promotor angetrieben wird und für einen Ampicillin-Resistenz-Marker, das Flag-Tag (3' von der MCS) und für die SV40-poly(A)-Sequenz kodiert (Fa. Invitrogen).
psp64	Klonierungsvektor, IVT: Sp6-Pol. (Fa. Promega)
pBSK/ pBKS	Klonierungsvektor, IVT: T3 oder T7-Pol. (Fa. Stratagene)
GST-4T2:	Bakterieller Expressions-Vektor; Die Protein-Expression ist unter der Kontrolle des tac-Promotors, welcher durch Zugabe von IPTG (Lactose-Analogon Isopropyl β -D-thiogalactoside) induziert wird (Fa. Pharmacia Biotech).

- pCDNA3-Pim-1-wt/K67M: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H.Karsunky, eigenes Labor, enthält dielange und kurze Pim-1-Sequenz, IVT: T7-Pol.
- Pim-1-wt/-K67M-GST-4T2: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B.Rödel, eigenes Labor, enthält nur die kurze Pim-1-Sequenz
- Pim-1-wt/-K67M-FlagN3: 5'-Pr.: *EcoRI*, 5'-CGGAATTCCTCCAGCCATGCTCTTGTCCAAAATC-3'; PimKozaksense 3'-Primer: *BamHI*, 5'-ATGGATCCTTTGCTGGGCCCCGGCGA-3'; PimRevStopBamHI; Ausgangskonstrukte: pCDNA3 Pim-1-wt und K67M in CMVFlag-N3
- Pim-1-wt/K67M-GFP-N3: siehe Pim-1-wt/-K67M-FlagN3; einziger Unterschied: GFP statt Flag
- psp64-Pim-1-wt: psp64-Vektor, Sp6 Polymerase-Startstelle, Ampicillin Resistenz-Marker; 5'-Primer: *PstI*, 5'-ATCTGCAGGCCACCATGCTCTTGTCCAAAATC-3'; 5'Pimsp64 3'-Primer: Stop, *XbaI*, 5'-TATCTAGACTATTTGCTCCCGGGGCC-3'; 3'Pimsp64 Ausgangskonstrukt: pCDNA3-Pim-1-wt, in psp64, IVT: Sp6-Pol.
- C-TAK1-Y6131-NFlag/C-TAK1-Y6131-L128P-NFlag: Dieses ist ein eukaryotischer Expressions-Vektor, der von einem CMV-Promotor angetrieben wird und für einen Ampicillin-Resistenz-Marker, das Flag-Tag (5' von der MCS) und für die hGH-poly(A)-Stelle kodiert. 5'-Primer: *Sall*, 5'-GTGTCGACACATGTCCACTAGGACCCCT-3'; C-TAK1(R)1 3'-Primer: Stop, *HindIII*, 5'-TAAAGCTTACTCTCTCAGTTCCTTCAG-3'; C-TAK1(R)2, Ausgangskonstrukt: der jeweilige C-TAK1-Y6131- oder L128P-Vektor in Pias-NFlag
- pspC-TAK1-Y6131/-L128P: 5'-Pr.: *Sall*, Kozak 5'-ATGTCGACGCCACCATGTCCACTAGGACCC-3'; C-TAK1-11 3'-Primer: Stop, *XbaI*, 5'-GCTCTACATTACTCTCTCAGTTCCTTCAG-3'; C-TAK1(R)10 Ausgangskonstrukte: C-TAK1-Y6131, C-TAK1-Y6131-L128P in psp64, IVT: Sp6-Pol.
- C-TAK1-Y6131/-L128P-GFP-N3: Vektor: GFP-N3, gleicher Vektor wie Flag-N3, bis auf das Flag; 5'-Pr.: Kozak, *XhoI*, 5'-CGCTCGAGCCAGCCATGTCCACTAGGACCCCT-3'; C-TAK1(R)3 3'-Primer: *BamHI*, 5'-CGGGATCCCTCTCTCAGTTCCTTCAG-3'; C-TAK1(R)4 Ausgangskonstrukt: GC-BY6131/-L128P, in CMV-GFP-N3
- GST-C-TAK1-Y6131: 5'-Primer: *SmaI*, 5'-ATCCCGGGATGTCCACTAGGACCC-3'; C-TAK1-7 3'-Primer: *NotI*, 5'-ATGCGGCCGCTCTCTCAGTTCCTTCAG-3'; C-TAK1(R)8 Ausgangskonstrukt: GC-BY6131, in GST-4T2
- pBSK-C-TAK1-wt/ α / β : 5'-Primer: *KpnI*, 5'-ATGGTACCATGTCCACTAGGACCC-3'; C-TAK1-14 3'-Primer: *KpnI*, 5'-GCGGTACCTTACAGCTTTAGCTCATT-3'; C-TAK1-12-1 Ausgangskonstrukt: CytotrapTMXR-Bibliothek (humane Leber-cDNA/Stratogene), in pBSK
- pCDNA3-C-TAK1-wt/ α / β : *KpnI* aus pBSK, IVT: T7-Pol.
- C-TAK1-wt/ α / β -GPF-N3: 5'-Pr.: *HindIII*, Kozak, 5'-GAAAGCTTGCCACCATGTCCACTAGGACCCCA-3'; C-TAK1-33 3'-Primer: *KpnI*, 5'-ATGGTACCCAGCTTTAGCTCATTGGA-3'; C-TAK1-32 Ausgangskonstrukt C-TAK1-pBSK, in CMV-GFP-N3
- C-TAK1-wt/ α / β -GST-4T2: 5'-Primer: *XhoI*, 5'-GACTCGAGCGATGTCCACTAGGACCCCA-3'; C-TAK1-35 3'-Primer: *NotI*, 5'-ATGCGGCCGCTTACAGCTTTAGCTCATT-3'; C-TAK1-17, Ausgangskonstrukt: C-TAK1-pBSK, in GST-4T2
- C-TAK1-wt-Flag-N3: *HindIII*, *KpnI* aus C-TAK1-wt-GFP-N3 in CMV-Flag-N3
- pCDNA3-C-TAK1- L128P/ N183A/ D196N (PM-PCR-Methode): In der ersten PCR wurde ein N-terminales C-TAK1-Fragment hergestellt: 5'-Pr.: *HindIII*, Kozak, 5'-GAAAGCTTGCCACCATGTCCACTAGGACCCCA-3'; C-TAK1-33 3'-Primer: L128P: 5'-CCATGATTAGGTAGGGTGTTCAGTT-3'; C-TAK1-41 N183A: 5'-GCATCTAACAATCGCGCTTCAGCCTTG-3'; C-TAK1-25 D196N: 5'-CTAAASCCGAAATTTGCTATTTTAATG-3'; C-TAK1-27, Ausgangsvektor: pCDNA3-C-TAK1-wt
2. PCR: 5'-Mega-Primer: PCR-Fragmente aus 1.PCR 3'-Primer: *XbaI*, 5'-CCTTCATGATTTGCTCTAGAGTG-3'; C-TAK1-Bank2 Ausgangsvektor: pCDNA3-C-TAK1-wt in pCDNA3 (*HindIII*, *XbaI*), IVT: T7-Pol.
- C-TAK1-L128/ N183A/ D196N-GFP: *EcoRI*/ *HindIII* aus pCDNA3-PM in C-TAK1-wt-GFP
- C-TAK1-L128/ N183A/ D196N-FlagN3: *EcoRI*/ *HindIII* aus pCDNA3-PM in CMV-FlagN3
- C-TAK1-L128/ N183A/ D196N-GST: *SstI* aus pCDNA3-PM in GST4T2-C-TAK1-wt
- C-TAK1-N-del-GST: 5'-Primer: *BamHI*, 5'-TTGGATCCGAGGTGCAATAAAGATA-3'; C-TAK1-28 3'-Primer: *NotI*, 5'-ATGCGGCCGCTTACAGCTTTAGCTCATT-3'; C-TAK1-17 Ausgangskonstrukt: pCDNA3-C-TAK1-wt, in GST-4T2
- GST-C-TAK1-1-111 (Ratte): 5'-Primer: *BamHI*, 5'-TTGGATCCATGTCCACTAGGACCC-3'; C-TAK1-22 3'-Primer: *XhoI*, 5'-CGCTCGAGTTAAATCTTCATTATTCT-3'; C-TAK1-29 Ausgangskonstrukt: C-TAK1-Y6131, in GST-4T2

GST-C-TAK1-81-178(Ratte)	5'-Primer: <i>Bam</i> HI, 5'-TTGGATCCGAGGTTGCAATAAAGATA-3'; C-TAK1-28 3'-Primer: <i>Xho</i> I, 5'-CGCTCGAGTCTGTGAACGATCCGTTT-3'; C-TAK1-30 Ausgangskonstrukt: C-TAK1-Y6131, in GST-4T2
GST-C-TAK1-165:	5'-Primer: <i>Bam</i> HI, 5'-TTGGATCCATGTCCACTAGGACCCC-3'; C-TAK1-22 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCTGCAGACACAATCTG-3'; C-TAK1-18 Ausgangskonstrukt: C-TAK1-wt-BSK, in GST-4T2, verwendet für AK-Herstellung
GST-C-TAK1-4-165:	5'-Primer: <i>Sma</i> I, 5'-ATCCCGGGAGGACCCCATTGCCAAC-3'; C-TAK1-42 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCTGCAGACACAATCTG-3'; C-TAK1-18 Ausgangskonstrukt: C-TAK1-wt-pCDNA3, in GST-4T2
GST-C-TAK1-11-165:	5'-Primer: <i>Sma</i> I, 5'-ATCCCGGGAATGAACGAGACACTGA -3'; C-TAK1-43 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCTGCAGACACAATCTG-3'; C-TAK1-18
GST-C-TAK1-24-165:	5'-Primer: <i>Sma</i> I, 5'-ATCCCGGGGGGCGTCAAGAAGTTAC-3'; C-TAK1-44 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCTGCAGACACAATCTG-3'; C-TAK1-18
GST-C-TAK1-37-165:	5'-Primer: <i>Sma</i> I, 5'-ATCCCGGGGGCTCGGTGTAGAAACTC -3'; C-TAK1-45 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCTGCAGACACAATCTG-3'; C-TAK1-18
GST-C-TAK1-297:	5'-Primer: <i>Xho</i> I, 5'-GACTCGAGCGATGTCCACTAGGACCCCA-3'; C-TAK1-35 3'-Primer: <i>Xho</i> I, 5'-CGCTCGACTGTCCTTCATGATTTGCTCTA-3'; C-TAK1-23
GST-C-TAK1-230:	5'-Primer: <i>Xho</i> I, 5'-GACTCGAGCGATGTCCACTAGGACCCCA-3'; C-TAK1-35 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCGTCATATTTCTTGCCCT-3'; C-TAK1-48
GST-C-TAK1-207:	5'-Primer: <i>Xho</i> I, 5'-GACTCGAGCGATGTCCACTAGGACCCCA-3'; C-TAK1-35 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGACCGCCCAACAGTAAATT-3'; C-TAK1-47
GST-CDC25C:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ingrid Hoffmann, DKFZ
CDC25C-Hygro3.1:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Mathias Montenarh, Homburg
GST-CDC25C-211:	5'-Primer: <i>Bam</i> HI, 5'-ATGGATCCATGTCTACGGAACCTCTTC-3'; CDC25C-7 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCTAGGCCACTTCTGCTCAC-3'; CDC25C-8 Ausgangskonstrukt: GST-CDC25C, in GST-4T2
GST-CDC25C-235:	5'-Primer: <i>Bam</i> HI, 5'-ATGGATCCATGTCTACGGAACCTCTTC-3'; CDC25C-7 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCGTTGTCCTTGAATTTTTC -3'; CDC25C-9 Ausgangskonstrukt: GST-CDC25C, in GST-4T2
GST-CDC25C-180-474:	5'-Primer: <i>Bam</i> HI, 5'-ATGGATCCCAAACCTAGGAGAAGAC-3'; CDC25C-10 3'-Primer: <i>Not</i> I, 5'-ATGCGGCCGCTCATGGGCTCATGTCCTT -3'; CDC25C-11 Ausgangskonstrukt: GST-CDC25C, in GST-4T2
CDC25C-FlagN3:	5'-Primer: <i>Bam</i> HI, 5'-ATGGATCCATGTCTACGGAACCTCTTC-3'; CDC25C-7 3'-Primer: <i>Bgl</i> II, 5'-TCAGATCTTGGTGTTCCT-3'; CDC25C-12 Ausgangskonstrukt: CDC25C-Hygro3.1, in CMV-Flag-N3
CDC25CSer216-FlagN3:	PM-PCR: 5'-Pr:Koz, <i>Xho</i> I,5'-TACTCGAGCCACCATGTCTACGGAACCTCTTC-3'; CDC25C5 3'-Primer: 5'-CAAGTTCTCTGGCATTGCCGGGGAGCGATATAG-3; CDC25C-13 Ausgangskonstrukt: CDC25C-FlagN3 2.PCR: 5'-Mega-Primer aus PCR1, 3'-Primer: <i>Bam</i> HI, 5'-ATGGATCCTGGGCTCATGTCCTTCAC-3'; CDC25C-6 Ausgangskonstrukt: CDC25C-FlagN3, in CMV-Flag-N3 (<i>Xho</i> I, <i>Bam</i> HI)
CDC25CSer216-GST:	PM-PCR: 5'-Pr: <i>Bam</i> HI, 5'-ATGGATCCATGTCTACGGAACCTCTTC-3'; CDC25C-7 3'-Primer: 5'-CAAGTTCTCTGGCATTGCCGGGGAGCGATATAG-3; CDC25C-13 Ausgangskonstrukt GST-CDC25C 2.PCR: 5'-Mega-Primer aus PCR1 3'-Primer: Stop, <i>Xho</i> I, 5'-CGCTCGAGTCATGGGCTCATGTCCTT-3'; CDC25C-4 Ausgangskonstrukt: GST-CDC25C, in GST-4T2 (<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I)
CDC25A-GST	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ingrid Hoffmann, DKFZ
GST-Jun1-233:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H.Hennemann, eigenes Labor
GST-Pias3	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K.Tavassoli, eigenes Labor
Pias3-NFlag:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K.Tavassoli, eigenes Labor
Evi5mut-Flag:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B.Fraß, eigenes Labor
pspCyclinE:	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C.Geisen, eigenes Labor, Sp6-Pol

7.2. Oligonukleotide zu Detektierungszwecken

mPim5:	5'-Primer: 5'-ATGCTCCTGTCCAAGATC-3'
mPim1:	3'-Primer: 5'-CGAATCCACTCTGGAGGA-3'
SOSs:	5'-Primer: 5'-TACCTCTATACTTTAACGTC-3'
SOSas:	3'-Primer: 5'-AGGACACCATTGAAGTTGTTTCAG-3'
Ura3a:	5'-Primer: 5'-AACCCAACTGCACAGAACAAAAAC-3'
Ura3b:	3'-Primer: 5'-GCTTCAAACCGCTAACAATACCTG-3'
Leu2a:	5'-Primer: 5'-AAATGCGGTGTTCTTGTCTGG-3'
Leu2b:	3'-Primer: 5'-AGGTIGATGCCGTTTTGTTAGGT-3'
Yes2b3:	3'-Primer: 5'-GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGC-3'
Myr4:	5'-Primer: 5'-AGACCATGGGGAGTAGCAAGAGCA-3',

7.3. Danksagungen

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht hat. Besonders hervorheben möchte ich meine Mutter, die es mit meinen beiden Brüdern und mir nicht immer leicht hatte.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Steffi, die oft darunter zu leiden hatte, wenn ich Extraschichten im Labor abarbeiten musste und mir in schweren Zeiten immer zur Seite stand. Weiter gilt mein Dank Peter und Ingrid die mich und Steffi in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Tarik Möröy für die Bereitstellung des Themas und für die konstruktiven Diskussionen, die immer wieder für neue Impulse bei der Bearbeitung verschiedener Fragestellungen geführt haben.

Ich danke weiter allen aktuellen Mitarbeitern der AG IV, die einem das Leben im Labor-Alltag erleichtert haben, notfalls durch unendliche und/oder unsinnige Diskussionen (Wojciech, Angelika, Inge, Denise, Christian, Lothar, Raif, Ralph W., Katharina, Hui, Nan, Jianmin, Michael, Brigitte, Birgit, Frau Tiefenhoff, Petra und Thomas).

Ein ganz großes Dankeschön an Klaus, den ich immer wegen Computersachen fragen konnte.

Dank an Inge und Wojciech für unterschiedlichste Laborarbeiten.

Michael danke ich für alle Bestellungen, die getätigt worden sind.

Das Spülen wurde zum Glück von Frau Tiefenhoff übernommen.

Durch die Kuchen und Kekse von Inge war es gewährleistet, dass keiner während der Arbeitszeit zu wenig zu Essen bekam.

Es grenzt an ein Wunder, dass Angelika mit mir noch nach so vielen Gelen, Minis, Maxis, Trafos und anderen Tätigkeiten redet. Vielen Dank für diese Arbeitserleichterung.

Weiter danke ich Denise, Raif, Christian und Lothar für meine Koffein-Abhängigkeit, die im letzten Zeitraum der Doktorarbeit sehr zugenommen hat.

Zusätzlich danke ich Denise für die Verbreitung von guter Laune.

Ferner möchte ich mich bei Raif bedanken, mit dem ich schon in einer WG zusammen gewohnt habe. Es hat Spaß gemacht, mit ihm zusammen zu arbeiten.

Bei Christian bedanke ich mich für den nötigen Beistand beim Zusammenschreiben.

Ferner möchte ich mich bei allen früheren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe IV bedanken. Der Verlust dieser Mitstreiter war nicht leicht. Hanjo, Thorsten, Holger, Christoph, Ralph B., Beate, Bernd, Eva, Kamiab, Tatjana, Ines, Branko und Sarah sorgten für ein angenehmes Arbeitsklima. Ich danke Hanjo, weil er ein großer Lehrmeister für mich war, Thorsten für jeglichen beruflichen und privaten Spaß und für die Aufmunterung, Beate für lehrreiche Diskussionen,

Bernd für seine Mühe, mir sein Computer-Fachwissen zu vererben und Eva, Kamiab, Tatjana, und Sarah für die gute Stimmung.

7.4. Lebenslauf

Name: Bachmann, Malte

Geburtsdatum: 07.12.1971

Geburtsort: Bremen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, seit dem 02.10.2000

Schulbildung: 1978 - 1982 Grundschule Rotenburg/ Wümme
1982 - 1984 Orientierungsstufe Rotenburg/ Wümme
1984 - 1987 Ratsgymnasium Rotenburg/ Wümme
1987 - 1991 Gymnasium Wuppertal-Vohwinkel
Abitur: 19.06.1991

Grundwehrdienst: 1991 - 1992 Lübeck/ Hamburg

Studium: 10.92 - 02.97 Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03.97 - 03.98 Diplomarbeit bei Prof. Dr. med. A.Scheid, Institut für med. Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema : "Untersuchungen zur HIV-1-Rev-vermittelten Genexpression"

Wissenschaftliche
Beschäftigung: seit 05.98 Wiss. Angestellter bei Prof. Dr. T. Möröy
Institut für Zellbiologie, Universität Essen,
Promotionsthema: "Funktion der Pim-1 Kinase in der Zellzyklus-Progression"

Bisherige Veröffentlichungen:

Rödel, B., Tavassoli, K., Karsunky, H., Schmidt, Th., Bachmann, M., Schaper, F., Heinrich, P., Shuai, K., Elsässer, P., Möröy, T. , The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3, EMBO 2000 Vol.19, No.21, 5845-5855

Poster-Präsentationen:

M.Bachmann, H.Hennemann, T.Möröy, Complex formation between Pim-1, CDC25C and C-TAK1: evidence for a regulatory role of Pim-1 at the G2/M checkpoint, 3rd International Conference on Signal Transduction, Dubrovnik, Croatia, 17 -23 May 2002

7.5. Ehrenwörtliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 23.09.2002

(Malte Bachmann)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 23.09.2002

(Malte Bachmann)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Funktion der Pim-1 Kinase in der Zellzyklus-Progression" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Malte Bachmann befürworte.

Essen, den 23.09.2002

(Prof. Dr. Tarik Möröy)